

***Laser Capture Microdissection* in Paraffin eingebetteter Gewebe als Werkzeug zur Bestimmung des Sialylierungsstatus von ausgewählten Zellpopulationen**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Jan Bartel
aus Bad Nauheim
Gießen 2016**

Biochemisches Institut des Fachbereichs Medizin der Justus Liebig Universität Gießen
Leitung: Prof. Dr. Linhard

Gutachter: PD Dr. Galuska

Gutachter: Prof. Dr. Bräuninger

Tag der Disputation:

12.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Sialinsäuren	6
1.2 Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Sialinsäuren	9
1.3 Lokalisierung und Entfernung von definierten Zellen und Zellarealen	16
2 Zielsetzungen	19
3 Material und Methode	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Chemikalien	20
3.1.2 Laborgeräte	21
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.4 Lösungen und Puffer	23
3.2 Probengewinnung	23
3.2.1 Schnitterstellung	23
3.2.2 Histologische Bearbeitungen	24
3.2.3 <i>Laser Capture Microdissection</i> (LCM)	25
3.3 Quantifizierung der Sialinsäuren	32
3.3.1 Standards	32
3.3.2 Analysevorbereitungen	32
3.3.3 HPLC	33
3.3.3.1 Gradient	35
3.3.3.2 Probenaufgabe	35
3.3.3.3 Probenanalyse	35
3.3.4 ESI-MS	36
4 Ergebnisse	39
4.1 Einführung und Versuchsgewebe	39
4.2 Entwicklung und Analysestrategie mit Hoden und Nebenhoden der Maus	39

4.2.1 Generelle Prüfung einer Kombination aus <i>Laser Capture</i> <i>Microdissection</i> und DMB-HPLC-MS Anwendungen	39
4.2.2 <i>Capture Device</i> Test	42
4.2.3 Färbetests Maus Hoden und Nebenhoden	43
4.3 Analyse Sialylierungsstatus Maus Lunge und Reproduzierbarkeit der Methode	45
4.3.1 Maus Lunge Bronchialepithelzellen	45
4.3.2 Maus Lunge Alveolarzellen	46
4.4 Vergleich des Neu5Ac-Gehalts transgener CMAS-negativer Mäuse Nieren (Unfähigkeit der Sialylierung von Podocalyxin und Nephtrin) mit dem der Wildtyp Nieren	48
5 Diskussion	51
5.1 Diskussionen der Ergebnisse	51
5.1.1 Analyse der Durchführung	51
5.1.2 Alleinstellung der Methode	52
5.2 Limitierungen der Methode	53
6 Ausblick	56
7 Zusammenfassung	57
8 <i>Summary</i>	58
9 Danksagung	59
Eidesstaatliche Erklärung	60
Lebenslauf	61
Quellenverzeichnis	62

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CMAH	CMP-Neu5Ac-Hydroxylase
CMAS	N-Acetylneuraminsäure-Cytidinmonophosphattransferase
CMP	Cytidinmonophosphat
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol
EIC	<i>Extracted Ion Chromatograph</i>
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
GlcN-6P	Glucosamin-6-Phosphat
GlcNR	Glukosamin mit verschiedenen möglichen funktionellen Resten
GNE/MNK	Uridinphospho-N-Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KDN	2-Keto-3-Deoxy-D-Glucero-D-Galacto-Nonoicacid
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LCM	Laser Capture Microdissection
LM	Laufmittel (Lösungsmittelgemisch)
ManNAc	N-Acetyl-D-Mannosamin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NANP	N-Acetylneuraminat-9-Phosphatase
NANS	N-Acetylneuraminsäure-Synthetase
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Ac-9P	N-Acetylneuramin-9-Phosphat
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
PolySia	Polisialinsäureketten (ab 8 verknüpften Sialinsäuren)
RP	reverse phased
TBA	Thiobarbituratsäure
UDP	Uridinphosphat
UDP-Glc-NAc	Uridinmonophosphat-N-Acetyl-Glucosamin

1 Einleitung

1.1 Sialinsäuren

Sialinsäuren sind α -Ketosäuren, welche ein C9-Rückgrat aufweisen und sich hierdurch von den am häufigsten im menschlichen Körper vorkommenden Zuckern mit C5- (Pentosen) oder C6- (Hexosen) Grundgerüsten unterscheiden (Angata & Varki, 2002). Sie kommen besonders in Wirbeltieren, wenigen höheren Nichtwirbeltieren und Bakterien vor (Schauer, 2009). Sialinsäuren oder deren Polymere besetzen bei zahlreichen sekretierten oder membrangebundenen Glykoproteinen und Lipiden die äußersten Positionen auf deren Glykanen (Aamelfot et al., 2014)(Crespo et al., 2013). Sie sind aufgrund ihrer exponierten Lage an vielen wichtigen Funktionen beteiligt, wie zum Beispiel Zell-Zell- und Zell-Protein-Interaktionen, Stabilisierung von Proteinen und den Transport von Ca^{2+} - und anderen positiv-geladenen Ionen (Traving & Schauer, 1998). Die Familie der Sialinsäuren umfasst mehr als 50 verschiedene Varianten von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 2-Keto-3-deoxy-*D*-Glucero-*D*-galacto-nonoicsäure (KDN) (Angata & Varki, 2002).

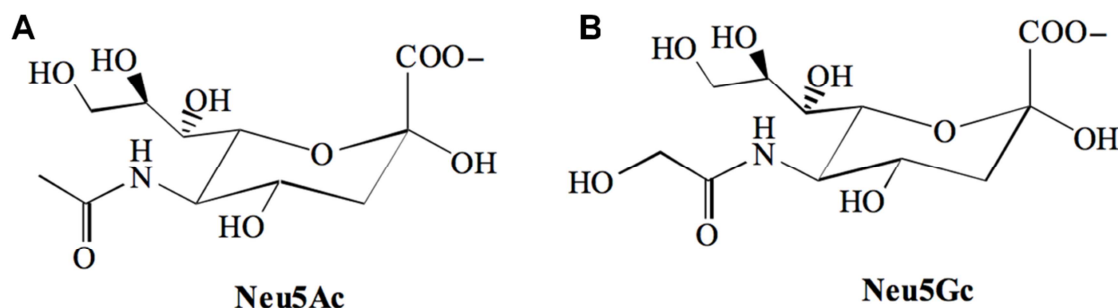


Abb. 1: Die Strukturen der am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren in der Gruppe der Säugetiere: **(A)** *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und **(B)** *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) (Freire-de-Lima et al., 2012).

Im Körper wird Neu5Ac im Zytoplasma synthetisiert und die Aktivierung erfolgt im Nukleus in Form von CMP-Neu5Ac (siehe Abb. 2). Unterstützt wird die Biosynthese von Sialinsäuren bei Säugetieren über den Durchfluss des Hexosamin-Stoffwechselwegs, welcher Uridinphospho-*N*-Acetyl-Glucosamin (UDP-GlcNAc) produziert (Hanover, 2001). Ein geringe Menge dieser im millimolaren Bereich synthetisierten zytosolischen nukleotid aktivierten Zuckern (Lau et al., 2007) wird zu *N*-Acetyl-*D*-Mannosamin (ManNAc) konvertiert (Du et al., 2009). Die endogene Biosynthese basiert auf dessen Phosphorylierung und ihrer anschließenden Verbindung mit Pyruvat. Nach der Aktivierung über die CMP-Neu5Ac-Synthase (CMAS) der Neu5Ac erfolgt der Transport in den Golgi-Apparat zu den Zielmolekülen

(Glykolipide und Glykoproteine)(Bayer et al., 2013)(Schauer, 2001)(Schauer, 2004).

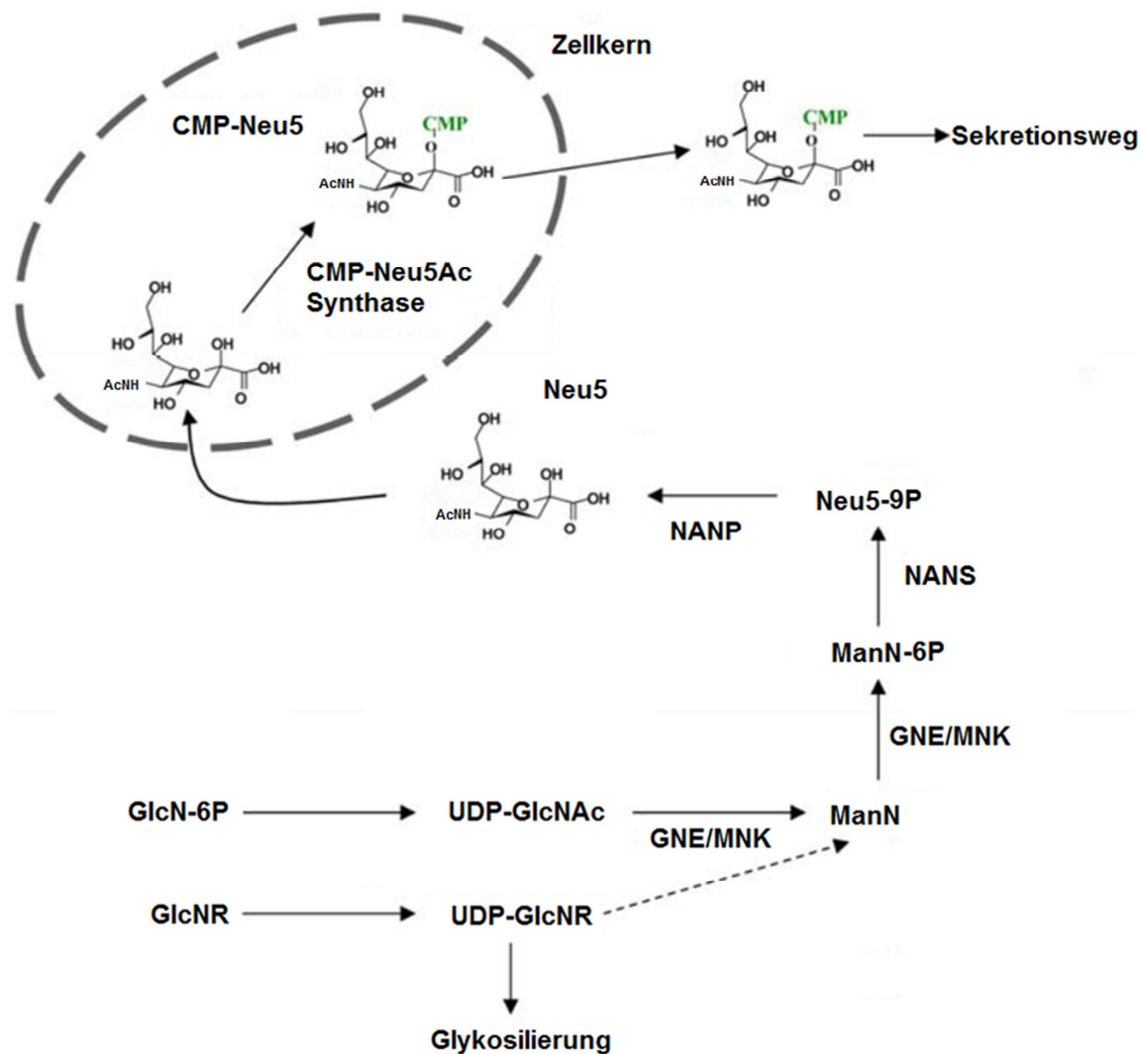


Abb. 2: Der endogene Biosyntheseweg von Sialinsäuren ausgehend von N-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc). Dieses wird auf zwei Wegen bereitgestellt, einmal aus GlcN-6P (Glukosamin-6-Phosphat) bzw. GlcNR als Vorläufermoleküle. ManNAc wird von GNE/MNK (Uridinphospho-N-Acetyl-glucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase) phosphoryliert und anschließend von NANS (N-Acetylneuraminsäure-Synthase) mit Pyruvat verbunden zu Neu5Ac. Über NANP (N-Acetylneuraminat-9-Phosphatase) wird schließlich die Phosphatgruppe abgespalten und die Sialinsäure gelangt daraufhin in den Zellkern, wo es von der CMP-Neu5Ac-Synthase mit CMP verbunden und somit aktiviert wird. In seiner aktiven Form wird es aus dem Zellkern in den Golgi-Apparat transferiert, von wo aus es an seinen Wirkort (Glykokalix, sekretierte Proteine etc.) weitertransportiert wird (Bayer et al., 2013; modifiziert).

Bereits vor den 1940er Jahren werden Sialinsäuren erforscht (Klenk, 1941) und verzeichnen ein stetig wachsendes Interesse in der Wissenschaft. Dies liegt an ihrer Beteiligung an vielen wichtigen Prozessen in der Natur von Säugetieren, wie zum Beispiel bei der neuronalen Entwicklung (Weinhold et al., 2005), in der Tumorphathologie (Seidenfaden et al., 2003), an Wechselwirkungen zwischen

Säugerzellen und pathogenen Keimen (Lewis & Lewis, 2012) und vielen weiteren Interaktionen.

Der Parasit *Trypanosoma cruzi*, der die Chagas-Krankheit verursacht, hat es sich beispielsweise zu Nutze gemacht, die körpereigenen Sialinsäuren des Wirts abzuspalten und auf seine eigenen Glykokonjugate zu übertragen. Dieses molekulare Mimikry nutzt der Parasit, um unentdeckt bleiben zu können. Der Mechanismus scheint ein so starker evolutionärer Vorteil zu sein, dass diese Art der Verteidigung durch Maskierung vor der körpereigenen Abwehr des Wirts bei vielen Parasiten zu beobachten ist (Freire-de-Lima et al., 2012).

Ein weiteres Beispiel für die außerordentliche Bedeutung der Sialinsäuren ist bei der neuronalen Entwicklung zu finden. Hier sind vor allem die Polysialinsäureketten (PolySia) als posttranslationale Modifikation vom *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) zu nennen. Diese negativ geladenen PolySia-Ketten inhibieren die homophile Interaktion zwischen NCAM-Molekülen. Dies ist beispielsweise wichtig für die Migration von Zellen während der neuronalen Entwicklung, da ohne PolySia-Ketten die Zellen an einander „festhängen“ bleiben würden und sich nicht trennen könnten (Rutishauser, 2008). In Mäusen wurde bereits bewiesen, dass das Fehlen von Polysialyltransferasen zu starken kognitiven Defiziten bzw. sogar zu einem nicht lebensfähigen Phänotyp führen kann (Galuska et al., 2008)(Weinhold et al., 2005).

Im menschlichen Körper gibt es eine Besonderheit in Bezug auf Sialinsäuren vor allem im Vergleich mit anderen nicht-menschlichen Hominiden; das fast vollständige Fehlen von Neu5Gc im menschlichen Körper (Muchmore et al., 1998). Es kann nur über die Ernährung, zum Beispiel durch rotes Fleisch, in den Körper gelangen. Dieser Unterschied - vor allem auch zu anderen nicht-menschlichen Hominiden - resultiert aus der inaktivierenden Mutation des Gens für die CMP-Neu5Ac-Hydroxylase (CMAH), die für die Generierung von Neu5Gc verantwortlich ist (Hayakawa et al., 2001). Besonders interessant wird dieser Fakt dadurch, dass die entsprechende CMAH-Mutation sich relativ schnell verfestigt hat, in ca. 0,3 Millionen Jahren, vor 3.2 Millionen Jahren bis vor 2,9 Millionen Jahren (Ghaderi et al., 2011). Der Grund für die Festigung der Mutation leitet sich von der Annahme ab, dass das Fehlen von Neu5Gc im Menschen vielen pathogenen Keimen, insbesondere früheren Malaria-Erregern, die Hominiden befallen, damals die Infektionsfähigkeit genommen hat. Diese nutzten Neu5Gc als Andockmöglichkeit an den menschlichen Zellen, im Gegensatz zu den heutigen, für den Menschen gefährlichen Plasmodien, die Neu5Ac hierfür verwenden. Ohne Neu5Gc waren diese Parasiten wohl wenig bis überhaupt nicht mehr infektiös für die

Träger der Mutation und verschaffte den Trägern des Gens einen evolutionären Vorteil (Martin et al., 2006). Da Menschen Neu5Gc aus der Nahrung einbauen, es sich jedoch um ein „fremdes“ Molekül handelt, besitzen Menschen Antikörper (AK) gegen Neu5Gc (Padler-karavani et al., 2013). Studien mit CMAH-negativen Mäusen zeigten, dass Neu5Gc positive Spermien von Neu5Gc-negativen Weibchen aufgrund derer AK gegen Neu5Gc abgetötet werden. Dies könnte ein weiterer möglicher Grund für die schnelle Fixierung der Mutation sein (Ghaderi et al., 2011). Des Weiteren könnte dies eine Erklärung für bestimmte Formen der männlichen Unfruchtbarkeit sein.

Ein weiteres Studienfeld ist die Tumorforschung. Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass Glykokonjugate auf Zelloberflächen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren spielen (Varki et al., 2009). Veränderungen der Zelloberflächen-Glykane waren eines der ersten nachgewiesenen Kennzeichen von Tumor-Zellen (Lloyd & Old, 1989)(Sell, 1990). Ebenso bekannt ist, dass das Vorkommen von Sialinsäuren und deren Polymere auf Tumor-Zell-Oberflächen sich von nicht Tumor-Zellen unterscheidet (Stoel et al., 2014). Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Expression einiger Sialinsäuretransferasen in bestimmten Krebsarten erhöht ist (Seales et al., 2005)(Wang et al., 2005)(Jun et al., 2012), zum anderen, dass Sialidasen wie zum Beispiel Neuraminidase1 in Tumoren runterreguliert wird (Uemura et al., 2009). Auch die Metastasierung und die Invasion von umliegenden Geweben von Tumoren ist von der Veränderung der Zelloberflächenstruktur und ganz besonders von der Sialylierung abhängig (Ranjan & Kalraiya, 2013). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die übermäßige Expression von bestimmten Sialytransferasen zu schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeiten bei Krebspatienten führt (Schneider et al., 2001).

Die beeindruckende Vielfalt der Sialinsäuren und die Vielseitigkeit ihrer Funktionen demonstrieren, wie wichtig Studien zu diesem Thema sind. Die Beteiligung an diversen pathologischen wie lebenswichtigen Prozessen zeigt die herausragende Bedeutung dieser Molekülfamilie. Um die biologische Verteilung zu analysieren gibt es verschiedene Nachweis- und Messmethoden, deren wichtigste Vertreter im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.2 Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Sialinsäuren

Um den Nachweis und die Funktion der verschiedenen Sialinsäuren und der Polymere zu erforschen, ist es wichtig auch deren genaue Lokalisation, Quantität und Qualität zu eruieren. Um Sialinsäuren zu erforschen wurden mehrere Analysemethoden

entwickelt, die im Laufe der Zeit immer weiter verfeinert wurden und schon mit Probenmaterial im fmol-Bereich eine genaue Aussage über Vorkommen und Menge dieser treffen können. Da es keine kommerziell erhältlichen AK gibt, mit denen man die unterschiedlichen Sialinsäurespezies spezifisch detektieren könnte, werden hauptsächlich chemische Verfahren für deren Nachweis angewendet.

Begonnen haben die Forschungen mit FarbabSORptionsmethoden wie zum Beispiel der Diphenol-Reaktion (Jouradian et al., 1971). Die Grundidee bestand in der Anfärbung der gesuchten Moleküle und der anschließenden Messung dieser. Diese stellten sich jedoch als relativ unspezifisch heraus, da auch Kohlenstoffgrundgerüste mit 5 oder 6 C-Atomen oder auch Harnsäure mit angefärbt wurden. Dies erforderte entsprechende vorausgehende Aufreinigungen der Proben, um valide Ergebnisse zu erhalten. Eine spezifischere und sensitivere Methode ist die Thiobarbituratsäure-Reaktion (TBA), in welcher spezifisch Sialinsäuren zu C7-Körpern umgebaut werden und dann mit TBA reagieren (Aminoff, 1961). Dies erlaubt dann die fluormetrische Bestimmung der Sialinsäuren. Für diese Methode reicht bereits 1 ng an Probenmaterial aus, um Sialinsäuren zu detektieren, wohingegen die Diphenol-Reaktion mindestens 1 µg benötigt. Da die TBA-Methode die Sialinsäuremoleküle umbaut, können nicht alle verschiedenen Sialinsäurevarianten gleich behandelt werden. Funktionelle Gruppen an C9, C8 und C7-Position müssen entfernt werden, damit hier eine Oxidation (Umbau zum C7-Gerüst) stattfinden kann. Auch lassen sich manche Substituenten nur schwierig oder gar nicht entfernen und interagieren mit der Thiobarbituratsäure, was zu einer Verringerung der Farbreaktion führt. Neben den beschriebenen Methoden gibt es noch weitere Färbetechniken zur Quantifizierung von Sialinsäuren, welche über eine Periodat-Reaktion funktionieren (Matsuno & Suzuki, 2008)(Hess & Rolde, 1964).

Jedoch haben all diese Methoden einen oder mehrere der folgenden Nachteile (Galuska, 2012):

- 1) Sie sind unspezifisch und benötigen eine Reinigung der Proben vor der Markierung.
- 2) Sie ermöglichen keine Unterscheidung der verschiedenen Sialinsäurevarianten.
- 3) Deren unterschiedlicher Aufbau beeinflusst das Ergebnis unterschiedlich stark.

Durch eine Fraktionierung bzw. Trennung der Analyten vor der Markierung kann man jedoch diesen Nachteilen entgegenwirken.

Zuerst verwendete man hierfür die Dünnschichtchromatographie (Schauer, 1978) welche auf dem Prinzip beruht, dass man eine flüssige Trägerphase hat, welche über

eine feste Träger-Phase (zum Beispiel ein Stück Papier) geführt wird. Durch die unterschiedlichen molekularen Eigenschaften der aufgetragenen Substanzen ergibt sich eine unterschiedlich lange Verweildauer der Moleküle auf der Trägerphase, was zur Auftrennung dieser führt. Eine weitere Technik zum Trennen von Sialinsäuren ist die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)(Inoue et al., 2001)(Livingston et al., 1988). Dieses System bietet den Vorteil des höheren Probendurchsatzes, der höheren Sensibilität, der höheren Genauigkeit und der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Galuska, 2012).

Der HPLC liegt das Prinzip der Flüssigkeitschromatographie zu Grunde. Dies besteht aus der Idee, dass ein heterogenes Substanzgemisch in einem Laufmittel (Lösungsmittel) als sogenannte flüssige Phase durch eine speziell beschichtete Säule (feste Phase) fließt, welche ausgehend von ihren chemischen Eigenschaften (z. B. polar oder unpolar) die verschiedenen Komponenten der zu untersuchenden Proben unterschiedlich lange festhält und hierdurch auftrennt. Die sogenannte Retentionszeit der verschiedenen Komponenten ist aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Beschaffenheit unterschiedlich. Das Prinzip ist vergleichbar mit der Dünnschichtchromatographie, lässt es aber zu zeitlich, veränderbare Bedingungen zu erschaffen (durch Anpassung der Laufmittelzusammensetzung), welche die Auftrennung verfeinern und gezielt steuern lassen. Das heißt bei der Dünnschichtchromatographie läuft eine Flüssigkeit über eine Membran, zum Beispiel Papier, und wird wie beschrieben aufgetrennt. Das System ist starr, die Komponenten sind unveränderlich während des Versuchsablaufes. Bei der HPLC gibt es durch Steuerung der Laufmittelzusammensetzung eine Möglichkeit, die Trennung zu variieren, um eine größere Trennschärfe zu erzeugen. Dies wird möglich dadurch, dass man zwei oder mehrere Laufmittel-Mischungen bereit hält und deren Verhältnis zueinander über einen Gradienten regelt, was zu einer Veränderung der Anhaftung von Molekülen an der Säule bewirkt. Hiermit kann die Zeit selbst angepasst werden, die eine Probe benötigt, um den Versuchsaufbau einmal komplett zu durchfließen. Der Sinn liegt darin, die Trennung so scharf wie möglich zu gestalten und die Zeit in der keine gesuchten Moleküle zu erwarten sind, so kurz wie möglich zu halten.

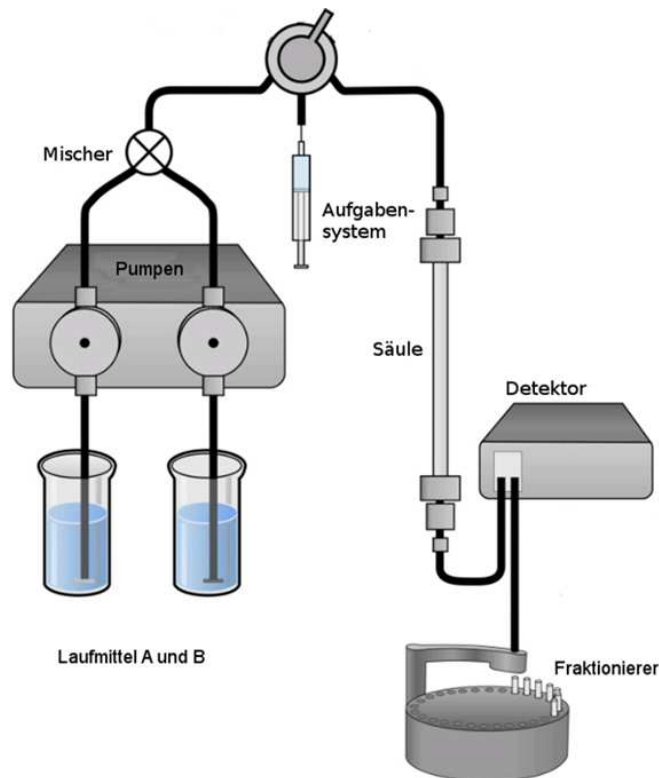


Abb. 3: Aufbau einer HPLC schematisch von links ausgehend: das System besteht aus der flüssigen Phase, einem oder mehreren Laufmitteln (zum Beispiel Lösungsmittelgemische), einer oder mehreren Pumpen und der Ventilsteuerung (Mischer; bei verschiedenen Laufmitteln). Es schließt sich das Aufgabensystem für Proben (Autosampler) an. Diese werden dann in einer Trennsäule unterschiedlich retiniert und anschließend zur Signalentstehung einem Detektor zugeführt (zum Beispiel Fluoreszenzdetektor) mit angeschlossenem Computer zur Datenauslese und Weiterverarbeitung. Bei Bedarf ist es möglich einen Fraktionierer anzugliedern, um einzelne Signale nochmals gesondert zu untersuchen. Quelle modifiziert (30.01.2015):

http://www.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Felte.prompt.hu%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Ftananyagok%2Fpractical_biochemistry%2Fimages%2Fm123e50b6.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Felte.prompt.hu%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Ftananyagok%2Fpractical_biochemistry%2Fch06s05.html&h=1017&w=866&tbnid=OdoBHSx2TRdYpM%3A&zoom=1&docid=7mtj45oXfYlrFM&ei=hmcLVPGdMYbzau3ZgOgM&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=279&page=1&start=0&ndsp=49&ved=0CCAQRQMwAA

Eine weitere Anpassungsmöglichkeit der HPLC-Systeme ist, dass durch die Möglichkeit von hohen Drücken von 200-1000 bar (HPLC bzw. Ultra-HPLC) die Oberfläche der festen Phase vergrößert und die Trennschärfe gesteigert werden kann. Dies wird ermöglicht durch die Wahl der Größe des Packungsmaterials (Adsorber-Kugeln) in der Säule und die hieraus resultierende Packungsdichte. Je größer die Packungsdichte, desto mehr werden die Probenmoleküle festgehalten, wenn sie

dieselben chemischen Eigenschaften aufweisen wie das Packungsmaterial. Der Säulenquerschnitt kann relativ klein (zum Beispiel 2-4mm) gewählt werden und die Säulenlänge kurz gehalten werden, was im Vergleich zu Systemen mit geringeren Drücken zu einer kürzeren Gesamtlaufdauer führt und zu einer höheren Auflösung bzw. Trennhärte. Gerade bei vielen Proben, die mit einem Autosampler-System aufgegeben werden reduziert dies zudem die Versuchsdauer stark.

Zuerst verwendete man Kationen- oder Anionen-Austauscher-Säulen ohne vorherige Markierung mittels eines Chromophors, um Sialinsäuren zu trennen (Honda & Suzuki, 1984). Die Nachweisgrenze und vor allem der Arbeitsaufwand bei HPLC-basierenden Applikationen kann jedoch erheblich gesenkt werden, wenn man die Probenmoleküle mit einem vorher speziell für die zu findenden Moleküle geeigneten Fluoreszenzmolekül verbindet. Im Falle von Sialinsäuren hat sich das Fluorophor 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB; siehe Abb. 4) als besonders geeignet erwiesen, welches beim Durchlauf durch einen Detektor ein Signal im Wellenlängenbereich bei 456 nm abgibt (Emission), wenn es mit einer Wellenlänge von 372 nm angeregt wird. Dies geschieht jedoch nur, wenn es mit einer α -Ketosäure, zu deren Gruppe auch die Sialinsäuren gehören, reagiert (Hara et al., 1987). Durch die Markierung mit diesem Fluorophor ist eine vorrangegangene Fraktionierung nicht mehr nötig. Probentrennung und Detektion laufen also parallel ab.

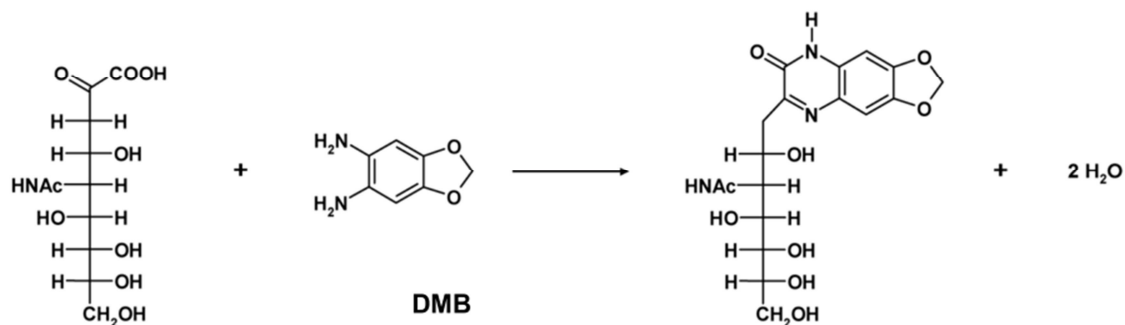


Abb. 4: Reaktion zwischen einer Sialinsäure und DMB unter Abspaltung von Wasser; in diesem Beispiel wird Neuraminsäure (Neu5Ac) gezeigt (Galuska, 2012).

Ein HPLC-Lauf stellt sich in einem Chromatogramm (siehe Abb. 5) graphisch als Aufreihung sogenannter „Peaks“ („Spitzen“) dar. Dies sollte bestenfalls dazu führen, nur die mit dem Fluorophor markierten Moleküle zu visualisieren. Gleichzeitig soll dadurch die Auftrennung chemisch ähnlicher Moleküle erreicht werden. Im Falle der DMB-markierten Sialinsäuren KDN, Neu5Gc und Neu5Ac funktioniert dieses mit einer *reverse phased* (RP) Säule (siehe Abb. 5).

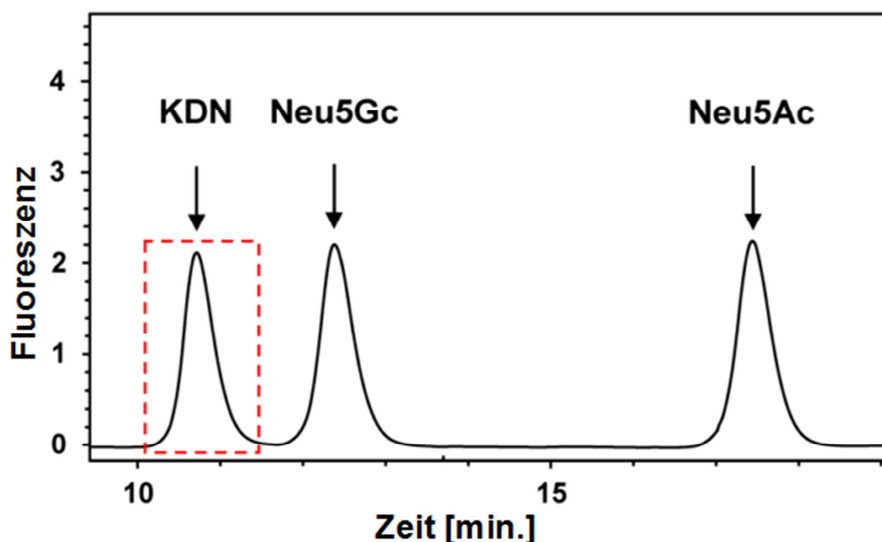


Abb. 5: Beispiel-Chromatogramm eines HPLC-Laufes für einen Dreier-Sialinsäure-Standard-Mix mit KDN, Neu5Gc und Neu5Ac (Galuska, 2012). Man sieht, dass die drei verwendeten Sialinsäuren nacheinander durch den hier verwendeten Fluoreszenz-Detektor erfasst werden. Die Chromatogramme mehrerer parallel verwendeter Standardgemische in unterschiedlichen Konzentrationen dienen zur Auswertung als Referenz für die Proben-Analyse.

Um mit Sicherheit den Analyten „richtig“ zu identifizieren und somit die Aussagekraft zu erhöhen, kann eine Kombination aus HPLC und Massenspektrometrie basierenden Applikationen erfolgen. Es wird über die Retentionszeit, der Molekülmasse sowie Fragmentierungsanalysen ein definitiver Nachweis über das Vorkommen von untersuchten Molekülen erreicht (Klein et al., 1997). Vor allem in den letzten zehn Jahren haben sich hier viele verschiedene Kombinationsverfahren aus LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* = Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie) entwickelt, welche ein weites Feld an Einsatzmöglichkeiten in der Biochemie, der Pharmakologie *et cetera* abdecken (Holčapek et al., 2012). *Electrospray Ionisation* (ESI)-MS-Applikationen wurden in dieser Arbeit als letzte Kontrollinstanz verwendet, um zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Moleküle auch definitiv vorkommen und nicht, ob „nur“ an der „richtigen Stelle“ im Chromatogramm ein Signal erscheint.

Das ESI-MS-Verfahren basiert auf der Idee, dass man Moleküle ionisiert und diese anschließend in einem elektrischen Feld (Ionenfalle) einfängt. Diese Ionen kann man gezielt durch eine angelegte Spannung manipulieren, die im System mit einer bestimmten Masse korreliert. So detektiert man schließlich bei angelegter Spannung X die Ionen der Masse Y und kann aufgrund der Signalstärke eindeutige Aussagen über das Vorhandensein dieser machen (Zaia, 2004). Des Weiteren ist die Kombination der DMB-HPLC Methode mit der ESI-MS sehr aussagekräftig und funktioniert äußerst zuverlässig, wie bereits früher gezeigt wurde (Huan Nie, 2012).

In unserem Falle ergibt sich die zu suchende Masse aus der Summe der Molekülmassen des Fluoreszenzfarbstoffes, der jeweiligen Sialinsäure und entweder eines Wasserstoff- oder Natriumions. Da während der Anlagerungsreaktion von DMB an den Zielmolekülen 2 Wassermoleküle abgespalten werden, muss deren Masse noch von der Summe subtrahiert werden (Abb. 6).

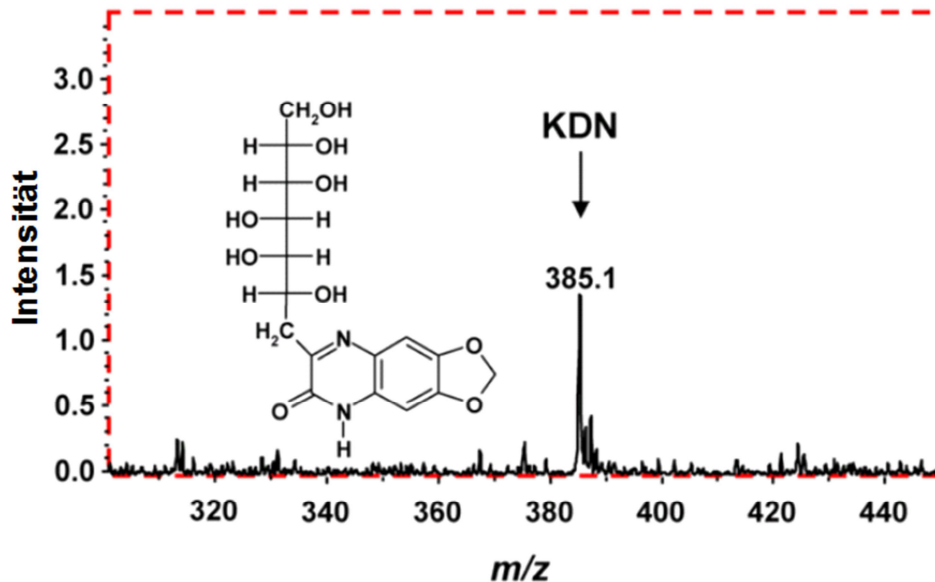


Abb. 6: Beispiel eines Massenspektrums von KDN+DMB+H⁺ Masse 385.1. Die Abbildung zeigt viele verschiedene Peaks, jedoch allesamt mit niedrigen (hier <0,5) Intensitäten. Das hier demonstrierte KDN ragt durch seine stark erhöhte Intensität (>1,5) aus der Hintergrundbelastung heraus (Abb. aus Galuska, 2012).

Die in Abbildung 6 gezeigte KDN ist eine Sialinsäure, die bisher nur in bestimmten Geweben im menschlichen Körper nachgewiesen werden konnte, unter anderem in roten Blutkörperchen, Eierstockgewebe (normal, tumorartig und in Krebsformen) und Lungen-Karzinomen. Sie kommt vor allem frei (ca. 80%), nicht gebunden an Zelloberflächen vor und macht nur 1/1000 bis 1/10000 der gesamten Menge an Sialinsäuren im untersuchten Gewebe aus (Inoue & Kitajima, 2006). Untersucht man KDN-negatives Gewebe, kann KDN als interner Standard eingesetzt werden. So kann der Arbeitsablauf kontrolliert und z. B. unbemerkte Probenverluste oder andere Fehler registriert werden (Galuska et al., 2010).

Da man mit der HPLC und der ESI-MS-Applikation nur sehr geringe Mengen an Probenmaterial benötigt (fmol-Bereich), ergibt sich hier die Möglichkeit sehr kleine Probenmengen zu untersuchen. Um zellspezifische Analyse durchführen zu können, muss es allerdings machbar sein, beispielsweise nur einzelne Zellen gezielt für die Analyse zu isolieren. Eine Möglichkeit stellt die folgende Methode dar.

1.3 Lokalisierung und Entfernung von definierten Zellen und Zellarealen

Um die Wirkung von Molekülen auf Zellen und Zellverbände zu untersuchen, muss man die gesuchten Moleküle aus diesen extrahieren. In den meisten Fällen werden hierfür die Gewebe und Organe komplett lysiert. Das heißt, man nimmt zum Beispiel ein komplettes Organ, wie die Niere einer Maus oder ein Stück dieser (makrozellulär ausgeschnitten) und homogenisiert es, um es wie bereits beschrieben mittels HPLC zu analysieren. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass man nicht sehr orts- und zellspezifisch arbeiten kann und eine Mischpopulation aus verschiedenen Zellen vorliegt. Eine zellspezifische makroskopische Selektion von Gewebeabschnitten bei kleinen Versuchstieren aber auch menschlichem Gewebe ist sehr schwierig bis unmöglich.

Um diesen Nachteil zu egalisieren, ist es notwendig einzelne Stücke aus den Proben in möglichst geringer Größe mit maximaler Genauigkeit zu entfernen. Bereits in den 1950er Jahren hat diese Erkenntnis zur Entwicklung einer Mikrodissektionsmethode geführt (Lowry, 1953), jedoch war die Anwendung sehr stark vom manuellen Geschick des Sezierers abhängig und sehr diffizil in der Durchführung, da „Frei Hand“ gearbeitet wurde. Es hat sich in den letzten Jahren die Methode der *Laser Capture Microdissection* (Emmert-Buck et al., 1996) in dieser Disziplin hervor getan. Sie wird bisher hauptsächlich verwendet um Genexpressionsanalysen durchzuführen (Espina et al., 2006). Mit ihr ist es möglich einzelne Zellen oder Zellverbände auszuschneiden (Zheng et al., 2013).

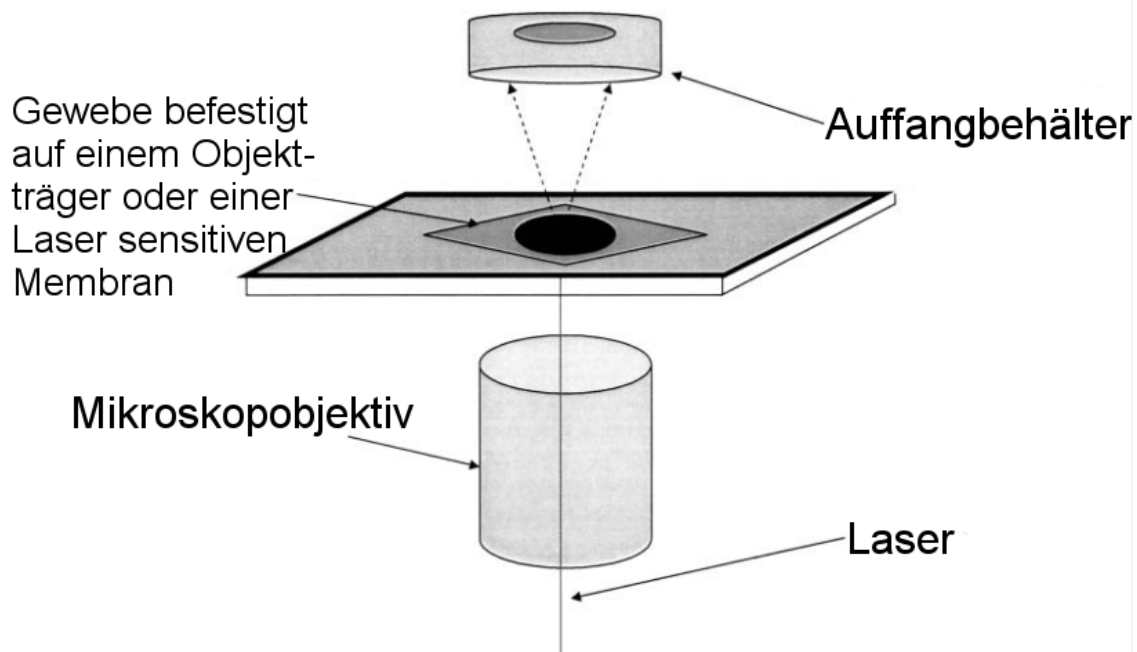


Abb. 7: Funktionsprinzip der *Laser Capture Microdissection* des PALM-Robo von Zeiss; der Gewebeschnitt ist auf einer speziellen Membran aufgezogen, welche auf einem Objektträger angebracht ist. Ein Laser aus Richtung des Mikroskop Objektivs kommend zerschneidet einen Bereich dieser Membran, der am Bildschirm eines *Personal Computers* ausgewählt wurde. Ein weiterer Laser-Impuls aus derselben Richtung mit erhöhter Stärke katapultiert anschließend den Probenausschnitt in einen Eppendorf-Gefäß-Deckel mit spezieller Beschichtung. Bild-Quelle: (Eltoum et al., 2002 modifiziert).

Die Vorteile sind, dass man nicht nur die Lokalisation besser eruieren kann, sondern man erhält auch die Möglichkeit direkt den Wirkungsort des Moleküls zu untersuchen, ohne störende Nebeneinflüsse aus anderen Organteilen oder Probenanteilen in makro-beziehungsweise mikroskopischer Umgebung in Kauf nehmen zu müssen, wie es bei heterogenen Komplettorganlysaten der Fall wäre.

Gerade bei der Untersuchung von Zelloberflächen von veränderten Zellen zu ihren unveränderten Pendanten ist es von entscheidender Bedeutung, dass man diese scharf voneinander trennen kann. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist die Bedeutung der Veränderung der Glykokalix auf Tumorzellen für die Invasion, Migration und Malignität entscheidend. Deshalb ist es wichtig, exakt die betroffenen Areale ohne Verunreinigungen zu extrahieren, um die Wirkmechanismen besser untersuchen, verstehen und bekämpfen zu können.

Bisher wurde das *Laser Capture Microdissection* Verfahren jedoch fast ausschließlich für mRNA-Analysen oder Western Blots angewendet. Eine Kombination von *Laser Capture Microdissection* mit Sialinsäure-Analysemethoden wie der *High Performance Liquid Chromatography* und dem *Electro Spray - Mass Spectrometry* würde viele neue

Forschungsprojekte ermöglichen, die aufgrund der aufgeführten Probleme bei der Analyse von kompletten Zellverbänden bzw. Organen *bis dato* unmöglich waren.

2 Zielsetzungen

Ziel meiner Doktorarbeit war es, eine mögliche Kombination aus der *Laser Capture Microdissection* mit der Fluoreszenz-HPLC und dem *Electro Spray - Ionisation Mass Spectrometry* (ESI-MS) Verfahren für die Analysen von Sialinsäuren zu entwickeln. Dabei standen folgende Punkte im Vordergrund:

- Die Methode sollte den Sialylierungsstatus zell- und gewebespezifisch analysieren können.
- Es sollten möglichst nur wenige hundert Zellen pro Analyse notwendig sein.
- Der Arbeitsablauf sollte eine Reproduzierbarkeit gewährleisten und somit neben der qualitativen auch die quantitative Bestimmung von Sialinsäuren ermöglichen.

3 Material und Methode

3.1 Materialien:

3.1.1 Chemikalien:

Produktname	Firma	Sitz	Land
Natriumhypochlorid-Lösung	Sigma-Aldrich	Hamburg	Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	Darmstadt	Deutschland
<i>Envision+ System- HRP-Labeled Polymer</i>	Dako	Glostrup	Dänemark
Albumin Fraktion V	Roth	Karlsruhe	Deutschland
<i>Eukitt quick-hardening mounting medium</i>	Fluka Analytical	Hamburg	Deutschland
RotiClear	Roth	Karlsruhe	Deutschland
RotiHistol	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Natronlauge 30%	Merck	Darmstadt	Deutschland
Methanol	Fluka Analytical	Hamburg	Deutschland
Acetonitril	Merck	Darmstadt	Deutschland
Ethanol 99,9%	Fluka Analytical	Hamburg	Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Anthranilsäure	Sigma-Aldrich	Hamburg	Deutschland
Natriumcyanborhydrid	Sigma-Aldrich	Hamburg	Deutschland
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe	Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Trifluoressigsäure	Promochem	Wesel	Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Hämalaunlösung, sauer nach Mayer	Roth	Karlsruhe	Deutschland
1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB)	Dojindo Laboratories	Kumamoto	Japan
Glukose-Oxidase	Sigma- LifeSciences	Gillingham	United Kingdom
D-(x)-Glukose	Sigma-Aldrich	Hamburg	Deutschland

Essigsäure 100%	Merck	Darmstadt	Deutschland
Natriumacetat	Merck	Darmstadt	Deutschland
Natriumhydrosulfid	Sigma	Hamburg	Deutschland
Borsäure krist. 99,8%	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Tetrahydrofuran	Merck	Darmstadt	Deutschland
2-Mercaptoethanol	Fluka	Hamburg	Deutschland
	Analytical		
Ammoniumchlorid 99% konz.	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Butylamin	Sigma-Aldrich	Hamburg	Deutschland
Diaminobenzidin	Roth	Karlsruhe	Deutschland

3.1.2 Laborgeräte:

Bezeichnung	Hersteller	Sitz	Land
Steuerungseinheit (steuert die Ventile für die verschiedenen Laufmittel)	Merck-Hitachi	Darmstadt	Deutschland
Hochdruckpumpe (erzeugt bis zu 200 bar)	Merck-Hitachi	Darmstadt	Deutschland
Autosampler (beinhaltet die Proben-, Standard- und Leerwertgefäße und entnimmt vorher festgelegte Mengen an Flüssigkeit nach definiertem Ablauf)	Spark	VE Emmen	Holland
Steuerungseinheit (siehe oben)	Knauer	Berlin	Deutschland
Hochdruckpumpe (siehe oben)	Knauer	Berlin	Deutschland
Fluoreszenz-Detektor (regt die Probengefäße etc. mit Licht einer vorher festgelegten Wellenlänge an und liest anschließend das ausgehende Signal und dessen Stärke aus)	Jasco	Gross-Umstadt	Deutschland
Fluoreszenz-Detektor (siehe oben)	Merck-Hitachi	Darmstadt	Deutschland
Waage	Mettler	Greifensee	Schweiz
Feinwaage	Mettler	Greifensee	Schweiz
Feinstwaage	Mettler	Greifensee	Schweiz
Reinwasseranlage	Millipore	Darmstadt	Deutschland

Reinstwasseranlage	Millipore	Darmstadt	Deutschland
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Licht-Mikroskop	Motic	Barcelona	Spanien
Mikroskop-USB-Kamera	Motic	Barcelona	Spanien
Thermo-Schüttler	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Kühlschrank	Bosch	München	Deutschland
Vortexer	Janke und Kunkel	Staufen	Deutschland
Heiz-/Magnetrührer	IKAMAG	Staufen	Deutschland
pH-Meter	Knick	Berlin	Deutschland
<i>Laser Capture Microdissection</i> (PalmRobo)	Zeiss	Oberkochen	Deutschland
Mikrotom	Leica	Wetzlar	Deutschland
Paraffinstreckbad	Medax	Kiel	Deutschland
<i>Speed-Vac</i> (Zentrifuge mit Vakuum)	Thermo Fisher Scientific	Waltham	U.S.A.
Wärmeplatte	Medax	Kiel	Deutschland
ESI-MS	Bruker-Daltonik	Bremen	Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien:

Bezeichnung	Hersteller	Sitz	Land
Pipettenspitzen weiß	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Pipettenspitzen gelb	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Pipettenspitzen blau	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Deckgläser	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Objektträger mit Membran	Carl Zeiss	Oberkochen	Deutschland
Objektträger ohne Membran	R. Langenbrinck	Emmendingen	Deutschland
<i>Safe-Lock</i> 2 ml Eppi	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
0,5 ml Eppi	Zeiss	Oberkochen	Deutschland
C18-Säule	Merck	Darmstadt	Deutschland

3.1.4 Lösungen und Puffer:

<u>Name:</u>	<u>Verwendung:</u>	<u>Zusammensetzung:</u>
LM-A	Laufmittel 1 HPLC	0,1% Trifluoressigsäure 4% Acetonitril 4% Methanol 91,9% H ₂ O
LM-B	Laufmittel 2 HPLC	0,1% Trifluoressigsäure 45% Acetonitril 45% Methanol 9,9% H ₂ O
DMB-Pufferlösung	Fluoreszenzmarkierung HPLC	1,22 mg DMB in 1 ml Lösung 1 M Mercaptoethanol (700,7 µl) 40 mM Trifluoressigsäure (30,8 µl) 18 mM Na.Hydrosulfit (31,3 mg) [für 10 ml Lösung]

3.2 Probengewinnung:

3.2.1 Schnitterstellung:

Es wurden verschiedene Formalin fixierte in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Mäusen verwendet. Von Frau Dr. Münster-Kühnel vom Institut für Zelluläre Chemie der Universität Hannover wurden Mäuse Nieren Proben zur Verfügung gestellt (Weinhold et al 2012) und von Prof. Dr. Middendorff vom Institut der Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen Mäuse Hoden, Nebenhoden (Simon et al., 2013) und Lungenproben (Ulm et al., 2013). Die verwendeten Paraffin-Blöcke wurden nach bereits beschriebenen Methoden hergestellt.

Mit einem Mikrotom (Bauart Leica LM 2255) werden 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte werden dabei direkt am Mikrotom in einem auf Raumtemperatur (20°C) gehaltenem Auffangbecken übertragen und von hier zur Entspannung und Glättung in ein auf 40°C temperiertes Wasserbad weitergeleitet. Die Schnitte verbleiben hier nicht länger als einige Minuten bis sie auf einen Objektträger aus Glas oder ein

MembraneSlide (Fa. Zeiss) übertragen werden. Danach werden die jeweiligen Objektträger auf eine Warmhalteplatte (40°C) zur weiteren Entspannung und Trocknung der Schnitte gelegt, worauf sie mindestens 60 Minuten verbleiben. Pro Objektträger können aufgrund der teils sehr geringen Größe der Organschnitte diverse Gewebeproben (2-12) aufgebracht werden. Anschließend platziert man die Schnitte über Nacht in eine Wärmekammer bei 37°C. Hiernach ist die Probenvorbereitung zur weiteren Verwendung abgeschlossen.

3.2.2 Histologische Bearbeitungen:

Zur Visualisierung der Kerne und zur besseren Orientierung im Gewebe wird die Hämalaun-Färbung nach folgendem Arbeitsschema angewendet (siehe Tab.1):

Tab.1: Hämalaun-Färbeprozedur der Standard Superfrost Langenbrinck und Zeiss-Membran Objektträger als Vorbereitung für die weitere Verwendung

Hämalaun-Färbung

<u>Reagenz</u>	<u>Durchgänge</u>	<u>Verweildauer</u>
RotiClear	3x	5 Min.
Ethanol 100%	1x	5 Min.
Ethanol 100%	1x	5 Min.
Ethanol 70%	1x	5 Min.
Aqua dest.	1x	5 Min.
Hämalaunlösung nach Mayer	1x	30-40 Sek.
Aqua dest.	1x	2 Min.
Bläuen, Leitungswasser (fließend)	1x	15 Min.
Ethanol 70%	1x	5 Min.
Ethanol 100%	1x	5 Min.
Ethanol 100%	1x	5 Min.

Bei den MembraneSlides der Firma Zeiss und den normalen Langenbrinck-Objektträgern (siehe Abb. 8) werden die Präparate nach der aufsteigenden Alkoholreihe an

der Luft getrocknet. Die Schnitte werden nicht mit einem Glasdeckel versehen, um die Katapultierung zu ermöglichen. Danach sind sie zur Verwendung bereit.

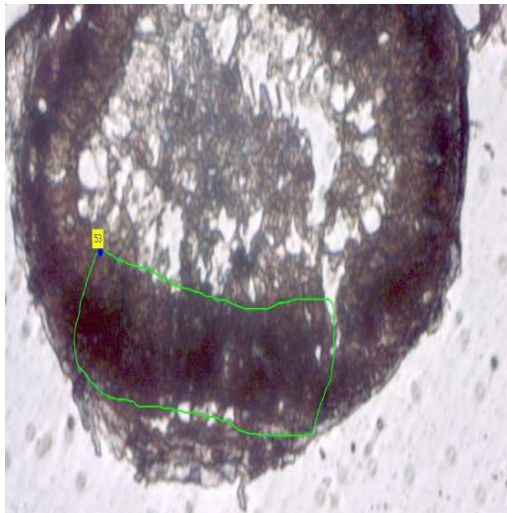


Abb.8: Zeiss MembraneSlides (mit Membran) unten, Standard Objektträger R. Langenbrinck SuperFrost-Plus oben. Die Membran ist der einzige Unterschied zu den Langenbrinck Objektträgern. Hierdurch ist es möglich, mit weniger Laser-Energie das ausgeschnittene Gewebeareal in den Auffangbehälter zu katapultieren und somit Verbrennungen am Gewebe zu minimieren bzw. ganz zu verhindern.

3.2.3 Laser Capture Microdissection (LCM):

LCM ist die Möglichkeit aus einem histologischen Präparat (ohne Glasdeckel) einen definierten Bereich gezielt zu entfernen und in den Deckel eines Eppendorf Röhrchens (Größe: 0,5 ml) zu katapultieren (siehe Abb. 9a und b) (Emmert-Buck et al., 1996).

a)



b)

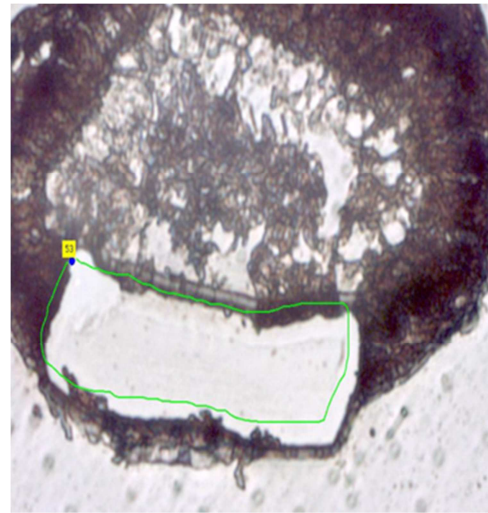


Abb. 9a und b: Maus Nebenhoden Tubulus Basalzellen markiert (grün) vor und nach dem Ausschneidevorgang LCM Versuch 2.

Hierzu wurde in meiner Arbeit das PalmRobo von Zeiss im Anatomischen Institut Gießen (siehe Abb. 10) verwendet.

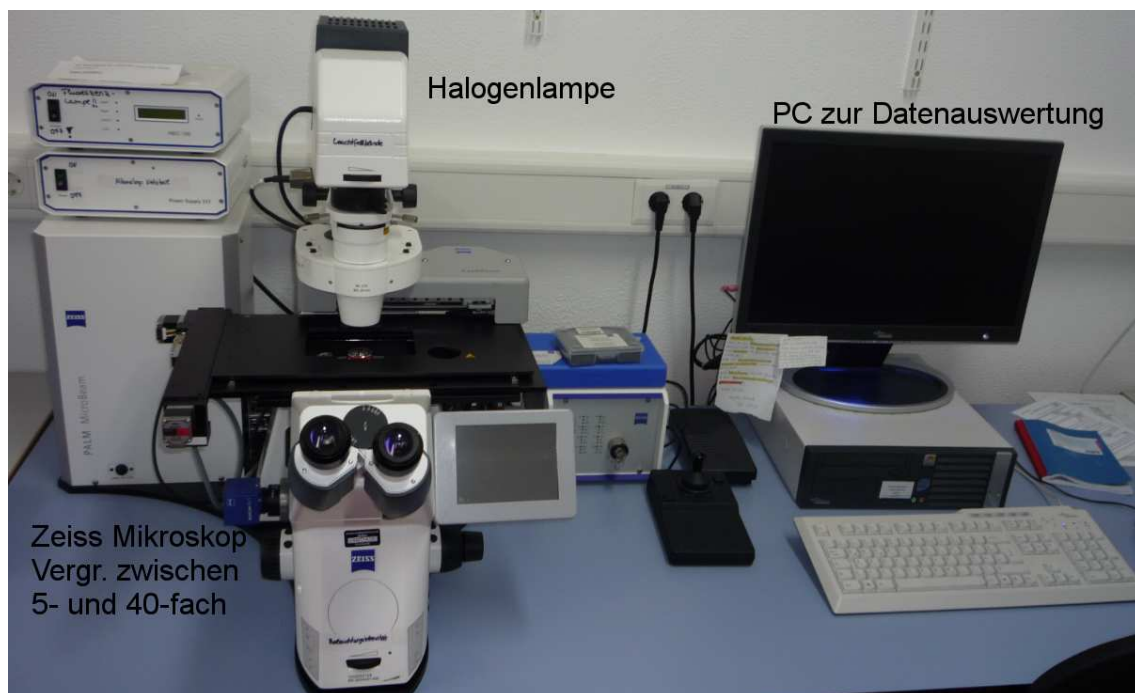


Abb. 10: PalmRobo Arbeitsplatzaufbau Fa. Zeiss: Anatomisches Institut Justus-Liebig-Universität Gießen; ein Zeiss Mikroskop mit Vergrößerungen zwischen 5- und 40-fach mit einer Halogenlampe und einer Videokamera, welche mit einem *Personal Computer* verbunden ist. Auf dem Mikroskoptisch ist eine spezielle Halterung angebracht (siehe Abbildung 11 und 12) für bis zu 3 Objektträger. Des Weiteren ist hinter den Objektträgern eine kleine Vorrichtung zur mechanischen Platzierung von Eppendorff-Röhrchen-Deckeln oder von Mikro-Titer-Platten über diesen angebracht. Sie ist ebenso per PC steuerbar und der Inhalt dieser so aufgefangenen

Proben ist per Einstellung auch am Monitor kontrollierbar. Dazu fährt der Mikroskoptisch zur Seite und den jeweiligen gewünschten Auffangbehälter über das Mikroskop. Man kann nun in einer Vergrößerung zwischen 5- und 40-fach den Inhalt fokussieren, auszählen und Verluste gegebenenfalls vermerken. Der Laser zum Ausschneiden und Katapultieren der Proben ist unterhalb der Objektträgerebene angebracht (siehe Abbildung 7).

Die Objektträger werden mit Hilfe einer Einspannvorrichtung fixiert. Bis zu drei Objektträger haben gleichzeitig Platz (siehe Abb. 11 und 12). Es ist auch möglich Mikro-Titer-Platten einzuspannen mit einer separaten Vorrichtung, welche jedoch in diesem Versuch nicht verwendet worden ist.

Damit nun das so entfernte Objekt im Deckel verbleibt, gibt es zwei Wege der Vorbereitung eines solchen Gefäßes. Nimmt man ein handelsübliches 0,5 ml Eppendorf-Gefäß, so muss dieses erst autoklaviert und direkt vor der Verwendung 1 μ l Mineral-Öl im Deckel aufgetragen werden, um die nötige Haftung der Proben zu erreichen. Diese Vorbereitungs-Maßnahmen entfallen bei speziell für die LCM entwickelten Zeiss AdhesiveCaps500 opaque oder clear, da diese bereits steril sind und über eine Beschichtung im Deckel verfügen, welche das Anhaften der katapultierten Proben erlauben. Auf die Qualität der Ergebnisse der Weiteruntersuchung haben die unterschiedlichen Probenröhrchen Einfluss (siehe Kapitel 4 Ergebnisse).

Es ist zu beobachten, dass es bei den Röhrchen mit Mineralöl möglich ist, dass nach längeren Ausschneidevorgängen die entstehende Hitze durch die Halogenlampe des PalmRobo zur Tropfenbildung führt, welches zur Folge hat, dass das Öl sich löst und auf den Objektträger tropft und bereits geschossene Areale mit sich reißt (siehe Abb. 11 und 12).

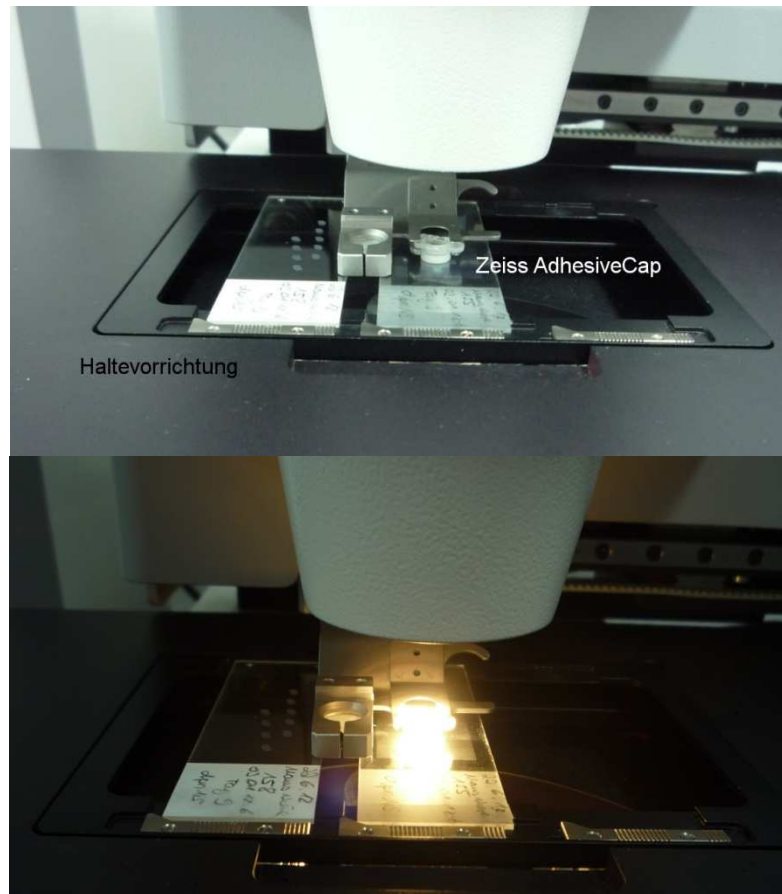


Abb.11 und Abb.12: Hier sind der in seiner Haltevorrichtung eingespannte Auffangbehälter (hier AdhesiveCap-Deckel) und der ebenfalls in einer Haltevorrichtung befindliche Objektträger im PalmRobo eingelegt, zu sehen, einmal bei ausgeschalteter Halogenlampe und bei eingeschalteter Halogenlampe. Die Deckelhaltervorrichtung ist in einem kleinen Roboterarm eingeklickt, so dass dieser per PC exakt die Positionierung des Deckels in der Vertikalen über den Objektträgern regulieren kann. Des Weiteren ermöglicht die rigide Fixierung der Objektträger in ihrer Haltevorrichtung, dass dieser ebenso per PC stufenlos steuerbar ist und beim automatischen Ausschneidevorgang vom PC gelenkt wird. Es ist möglich auch manuell den Tisch zu bewegen, wenn zum Beispiel ein Organ abgesucht werden soll, nach den Zielzellen oder speziellen Gewebeteilen.

Die oben genannte Feststellung, die einfachere Handhabung und die Vermeidung des Überhitzungsproblems des Mineralöls führten nach Vorversuchen zur Entscheidung die Zeiss AdhesiveCaps als Auffangbehälter zu nutzen. Das Cap-Modell „Opaque“ (milchig-weißliche Beschichtung) wurde anstatt dem Modell „Clear“ (durchsichtige Beschichtung) zur besseren Identifikationsmöglichkeit der geschossenen Areale ausgewählt (siehe Abb. 16 weiter unten).



Abb.13: In diesem Bild ist nur der Deckel (das *Cap*) des Zeiss AdhesiveCaps Röhrchens zu sehen. Dies entspricht auch dem Standardvorgehen während des Versuchsablaufes. Zuerst wird der Deckel vom Röhrchen abgetrennt für besseres *Handling*, sodass nur der Deckel und nicht das gesamte Röhrchen eingespannt werden muss. Nach Abschluss des Ausschneidevorgangs kann dieser Deckel dann in ein weiteres verschließbares Gefäß gegeben werden zur einfacheren Weiterverarbeitung.

Die Probengewinnung erfolgt durch Auswählen der Bereiche im Präparat am Monitor. Der Computer vermerkt hierzu die Größe der ausgeschnittenen Fläche und das anschließende Nachfahren des angegebenen Pfades mittels Laser. Nach dem Ausschneiden schießt dieser einen nochmals geringfügig stärkeren Puls (ca. 10-20% mehr Leistung) auf das so herausgelöste Gewebe und katapultiert es in den Deckel. Hierbei ist es entscheidend, dass dieser Puls ausreicht, um das Gewebestück auch bis zum Deckel zu transportieren, dabei jedoch nicht so stark ist, dass das Stück dabei beschädigt oder sogar verbrannt wird (siehe Abb. 14 Laser-Bedienfeld).

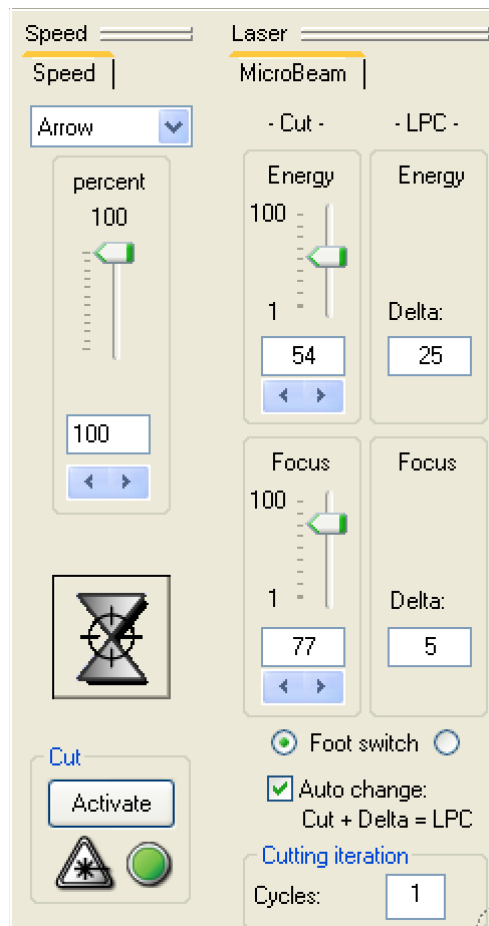


Abb. 14: PalmRobo (Zeiss) Laser-Bedienfeld: Die Einstellungsmöglichkeiten des Lasers des PalmRoBo sind großzügig; es gibt unter anderem folgende Optionen: *Speed Arrow*: Geschwindigkeit des Auswählpfeiles zum Markieren von Gewebe, *Laser Microbeam Cut Energy*: bezeichnet den Energiegehalt des Laserstrahls und *LPC Energy* die Energieerhöhung, die der Laser-Extraktionspuls erhält, um das ausgeschnittene Gewebe nach Abschluss dieses Vorgangs in den Auffangbehälter zu katapultieren. *Focus* und *Focus Delta* stehen für die Einstellung, welche die Breite des Laserstrahls und die Fokussierung seiner Energie auf das vorher festgelegte Zielgebiet haben soll. Der *Button* oberhalb des Wortes *Cut* ist zum Starten des Lasers. Ebenso kann der *Activate Button* hierfür genutzt werden. Nachdem der Vorgang gestartet wurde, erscheint an Stelle des *Activate Buttons* ein *Deactivate Button*, welcher den Laser unverzüglich stoppt; ein Notausschalter. Es sei noch die Möglichkeit erwähnt, den Laser per Fußbedienung

zu steuern (*Foot switch*) und dass man die Menge der Laserschneidezyklen (hier *Cycles* unter *Cutting iteration*) einstellen kann. Dies bedeutet, dass man den Lasern die vorgegebene Route x-mal abfahren lassen kann. Gerade bei sehr dichtem Gewebe erscheint es sinnvoll, mehrmals den Schneidevorgang mit niedriger Energie durchzuführen und nicht einmal mit viel Energie, weil es sonst zu Verbrennungen des Gewebes kommen kann.

Zur besseren Vereinheitlichung der Ergebnisse werden immer mindestens 15 bis 40 Schnitvorgänge vorgenommen, um Ungleichheiten in der Schnittebene auszutarieren. Zur Kontrolle des Ergebnisses des Ausschneidevorganges werden danach die Deckel des Aufnahmegefäßes visuell unter dem Mikroskop überprüft (siehe Abb. 16) und die Bilder gespeichert mit der in der PalmRobo-Software dafür angelegten Option.



Abb. 15 und 16: links: Maus Niere Probe LCM Versuch 25, grün umrahmt, Glomeruli vor Katapultierung bei 20-facher Vergrößerung; rechts: geschossene Glomeruli in einem Abschnitt des Zeiss AdhesiveCap opaque bei 5-facher Vergrößerung.

Vor und nach allen Ausschneidevorgängen werden ein oder mehrere Bilder des jeweiligen Ausschnittes in den Vergrößerungen zwischen 5 und 40fach angefertigt (siehe Abb. 16,17 und 18). Dies dient sowohl der Auswertung als auch der Nachverfolgung von möglichen unerwarteten Ergebnissen der biochemischen Aufarbeitung.

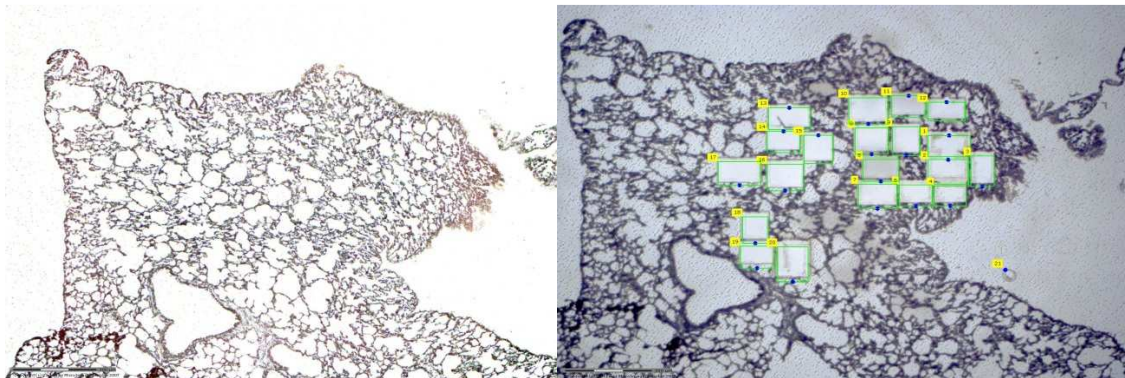


Abb. 17 und 18: Maus Lunge LCM Versuch 14; Übersichtsaufnahme 5-fache Vergrößerung vor und nach dem Ausschneidevorgang, grüne Markierung zeigt die ausgewählten Ausschneidebereiche an, hier nach der Extraktion.

Nach der abgeschlossenen Probenaufnahme erfolgt die Transferierung der Deckel samt der daran haftenden isolierten Zellen in ein 15 ml Glasröhrchen oder in ein 2 ml SafeLock Eppendorf-Gefäß (siehe Abb. 19). Dafür werden die Deckel der Zeiss AdhesiveCaps bereits vor der Einbringung in den PalmRobo vom Eppendorf getrennt.

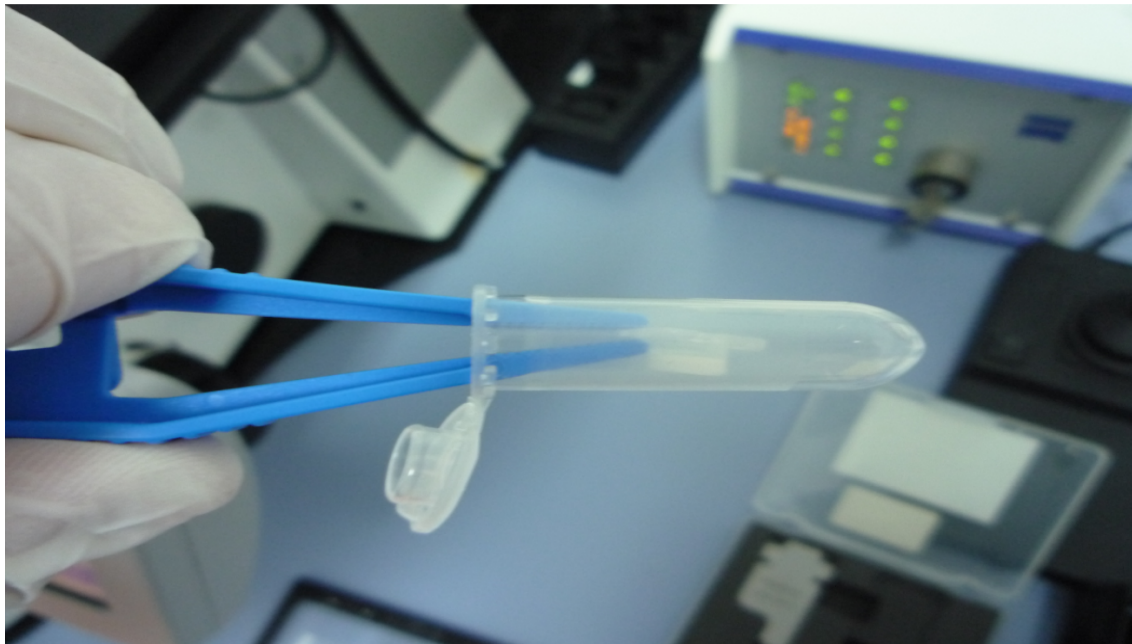


Abb. 19: Zeiss AdhesiveCap opaque Deckel in 2ml SafeLock Eppendorf Röhrchen nach Kontrolle der Laser-Katapultierung zum Transport und Hydrolyse in diesem Gefäß untergebracht.

3.3 Quantifizierung der Sialinsäuren:

3.3.1 Standards:

Für die spätere Quantifizierung mittels HPLC ist es notwendig Standards und Leerwerte mitzuführen, um die Signale auswerten zu können. Das heißt es werden Lösungen der zu suchenden Komponente in bekanntem Konzentrationsverhältnis ebenfalls parallel aufgearbeitet und analysiert. Als Leerwert (mindestens zwei) werden ein oder mehrere Gefäßdeckel ohne Probe genommen, um auch hier eventuelle Hintergrundsignale als solche zu erkennen. Dies betrifft auch reine MembraneSlide-Membranproben, welche zusätzlich mitlaufen. Für alle Proben, Standards und Leerwerte sind die nun folgenden Schritte identisch. Diese werden nachfolgend zusammenfassend nur noch als Proben bezeichnet.

3.3.2 Analysevorbereitungen:

Zuerst wird eine Hydrolyse mit 500 µl 2 M Essigsäure für 1,5 h bei 80 °C (in Anlehnung an (Hara et al., 1989)) durchgeführt. Wichtig ist hierbei, dass sich keine Blase zwischen der *opaque*-Schicht der Zeiss Deckel und der Essigsäure befindet, damit die Hydrolyse alle Bereiche betrifft (siehe Abb. 20). Danach werden 450 µl dieses Probengemisches

in ein 0,9 ml Glas *Vials* transferiert. Ab hier erfolgen alle weiteren Schritte in diesen Gefäßen (siehe Abb. 21).

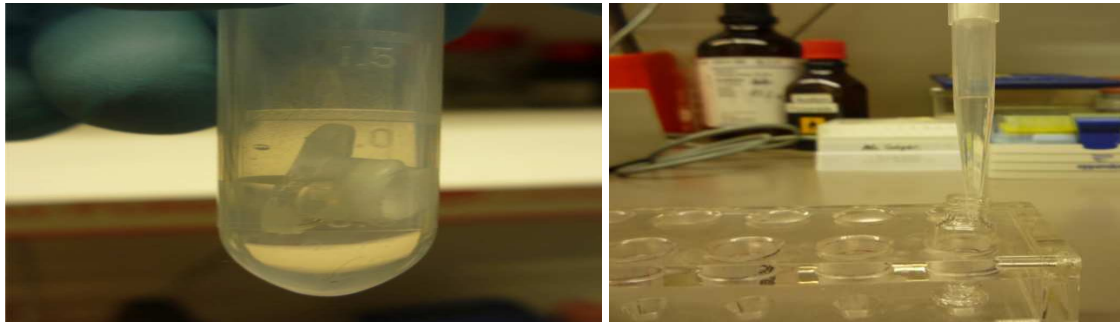


Abb. 20 und 21: Beispiel für die von Essigsäure blasenfrei umschlossene Zeiss-*opaque*-Deckschicht und die anschließende Übertragung der Probenflüssigkeit, nach Hydrolyse, mittels 1 ml Pipettenspitze in ein 0,9 ml Glas-*Vial*.

Diese *Vials* werden nun in einer „*SpeedVac*“ trocken gezogen (2 h bei 35 °C), um die Essigsäure und alle weiteren flüchtigen Komponenten zu entfernen. Hiernach erfolgt die Markierung mit DMB, um im Fluoreszenzdetektor (Jasco oder Merck-Hitachi, Wellenlänge Extinktion 372 nm Emission 456nm) ein Signal für Neu5Ac, KDN und/oder Neu5Gc zu erhalten (Hara et al., 1987). Dieser Vorgang wird mit 80 µl einer 1:1 verdünnten Lösung (1 Teil Wasser und 1 Teil DMB in Pufferlösung, siehe 3.1.4) vorgenommen, welche zu jeder Probe hinzugefügt wurde. Danach wird dieses Gemisch für 2 h bei 55 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, müssen die *Vials* erst auf Raumtemperatur (20° C) abkühlen, um 20 µl 0,2 M NaOH zuzugeben. Sind diese Vorbereitungen abgeschlossen, erfolgt die Probenanalyse mittels HPLC.

3.3.3 HPLC:

In der HPLC bestehend aus einer Knauer Hochdruckpumpe (Drücke bis ca. 200 bar möglich), Laufmittel A und B (siehe 3.1.4), einem Midas Aufgabesystem (auf 4°C gekühltem Midas AutoSampler) und einem Fluoreszenzdetektor (Jasco oder MerckHitachi) erfolgte die Auftrennung der Probengemische mittels einer LiChroCart 250-2 Superspher 100 RP-18e-Säule von Merck (siehe Abb. 22). Die Probendurchläufe benötigten je nach *SetUp* zwischen 30 und 60 Minuten, um alle Probenbestandteile einmal die Säule passieren zu lassen und alle Reste von der Säule zu „waschen“. Die Datenanalyse erfolgte mittels der Eurochrom2000 *Software* auf einem *Personal Computer*.

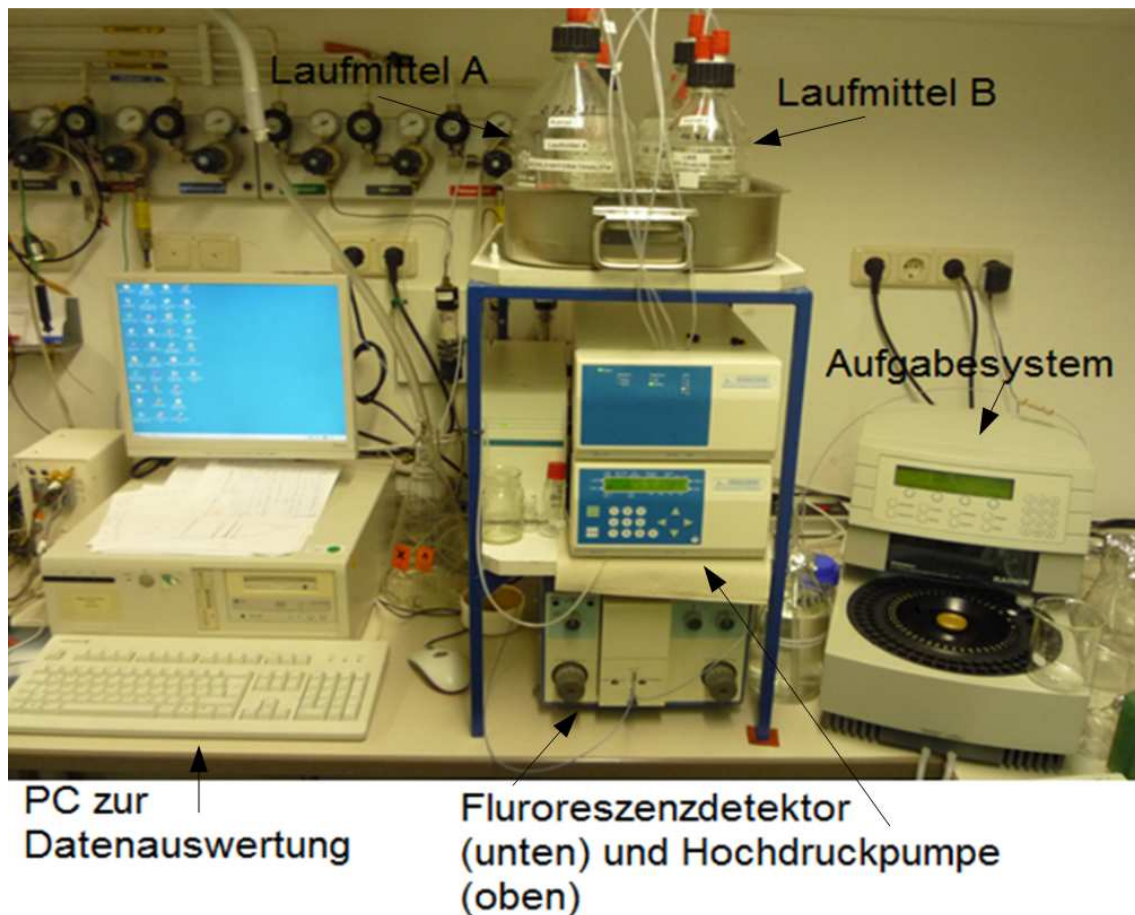


Abb. 22: Beispiel für die komplette HPLC-Anlage: Ein PC zur Datenauswertung, welcher über einen Analog/Digital-Wandler (kleine Box neben dem Monitor) mit dem Fluoreszenz-Detektor (Merck-Hitachi) verbunden ist. Laufmittel A und B werden von einer Hochdruckpumpe (Knauer) mit Ventil, je nach Gradientenprofil gesteuert, zugeführt und danach mit einer vorher am Aufgabensystem (Midas) definierten Menge Probenflüssigkeit versorgt, welche anschließend die Säule durchläuft und danach am Detektor ankommt. Hiernach ist es möglich die am PC als *Peaks* im Chromatogramm erscheinenden Stoffe zu fraktionieren oder als Abfall zu verwerfen.

Das Mischverhältnis von Laufmittel (LM) A zu Laufmittel B (Zusammensetzung der LM siehe 3.1.4) wird über die Dauer eines Zyklusses verändert (Gradient siehe Tab. 2) damit eine optimale Separation zu gewährleisten ist und gegen Ende dessen das vollständige Auswaschen der Proben von der Säule sichergestellt ist.

3.3.3.1 Gradient:

Tab. 2

Minute:	% LM-B
0	0
2	0
20	5
25	9
30	15
35	100
40	100
55	0

3.3.3.2 Probenaufgabe:

Nach dem Abschluss aller Vorbereitungen erfolgt die Aufgabe der Proben mittels Autosampler in einer vorher festgelegten Anordnung. Diese ist von entscheidender Bedeutung für eine Kontrolle der Ergebnisse. D.h. man wechselt die Standards mit Proben und Leerwerten ab, um eventuelle Abweichungen, wie zum Beispiel Verschiebungen im Chromatogramm anhand der Standardwerte erkennen zu können. Da die Standards in unterschiedlichen Konzentrationen, aber mit bekanntem Verhältnis zueinander ausgewählt sind, kann man die Ergebnisse exakt vergleichen. Die verwendete Software zur Datenaufnahme war die Eurochrom2000 HPLC Software Version 1.65.

3.3.3.3 Probenanalyse:

Nach Abschluss der HPLC-Läufe wird anhand der Signale (*Areas*) der verschiedenen Standardkonzentrationen (bei bekannten Volumina) sowie der Leerwerte eine Kalibrierungsgerade erstellt (siehe Standardgerade Abb. 23). Die *Areas* bezeichnen die Fläche unter dem Graphen des Fluoreszenzsignals in der Software.

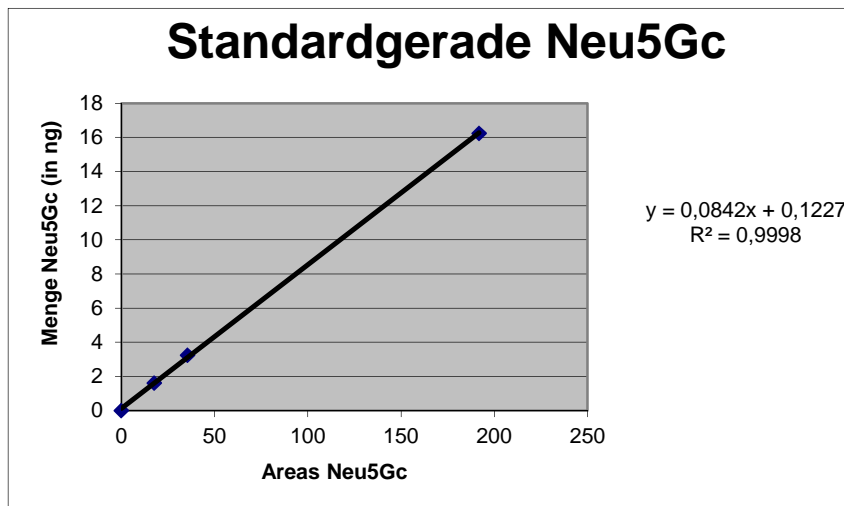


Abb. 23: Maus Lunge LCM Versuch 8 Berechnung der Standardgerade mit Abweichungskoeffizient R^2 . Der Koeffizient bestimmt wie exakt die Verarbeitung der unterschiedlich stark verdünnten Standards und damit letztendlich aller Proben durchgeführt wurde und erlaubt bei größtmöglicher Annäherung an $R^2=1$ auch eine umso größere Verlässlichkeit der Ergebnisse.

Mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden kann man anhand der Signalstärke (Areas) die Menge der Sialinsäuren berechnen, da eine Korrelation zwischen Anzahl Area X und Menge Sialinsäure Y. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, werden zusätzlich die eluierenden Substanzen direkt mittels ESI-MS analysiert.

3.3.4 ESI-MS:

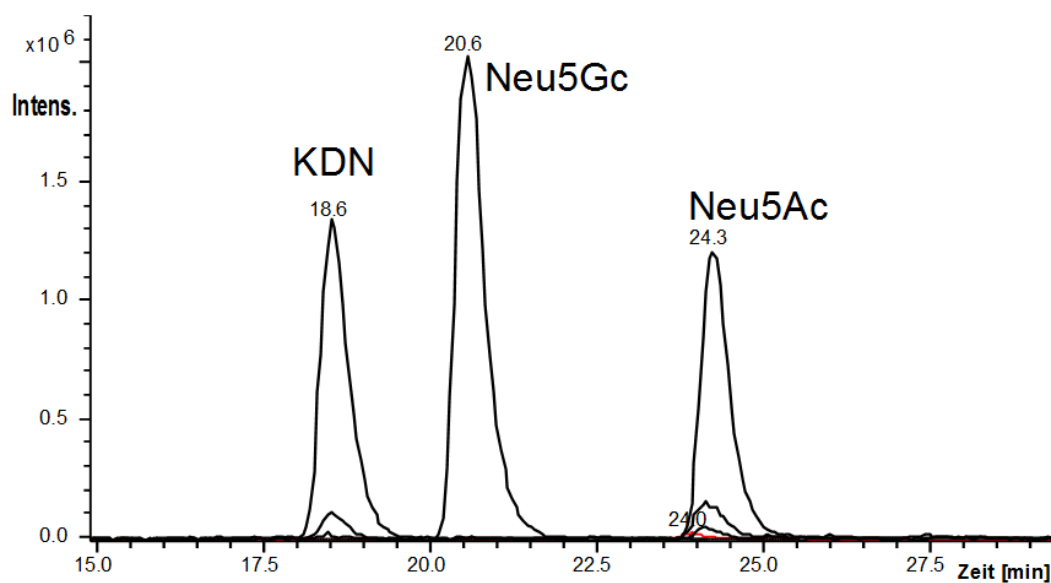
Die endgültige Bestimmung der Anwesenheit von Sialinsäuren erfolgt durch Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie. Direkt nach dem Fluoreszenzdetektor ist das ESI-MS Ultimate LC System angeschlossen mit Koppelung an eine Esquire 3000 ESI-Ionenfalle. Um zu überprüfen, welche Sialinsäuren vorhanden sind, sucht man nach den typischen Ionen dieser. Es sind jeweils verschiedene Addukte (z.B. Na^+ oder H^+) und die Abspaltung von Wasser möglich ($[\text{M}+\text{H}]^+-\text{H}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$) (siehe Tabelle 3). Wenn bei den zu erwartenden Retentionszeiten Ionen von DMB markierten Sialinsäuren vorhanden sind, ist die Anwesenheit bestätigt siehe Abb. 24a und b.

Tab. 3:

Massentabelle für die Additionsprodukte von KDN, Neu5Gc und Neu5Ac mit H^+ und Na^+ und das Subtraktionsprodukt mit H_2O (M-18). Die Spalte MS-MS zeigt die Massenwerte bei einer in Reihe geschalteten Massenspektrometrieanlage. Hier wird zuerst ein Elektrospray im ersten erzeugt, welches den gesamten Massenbereich anzeigt. Beim zweiten MS wird eine bestimmte Masse des ersten selektiert und erneut fragmentiert, was ein spezifisches Massenmuster an Bruchstücken erzeugt, welches eine eindeutige Zuordnung zu einem Molekül zulässt anhand der vorhanden Bruchstücke.

Sialinsäure	Zeit (min)	(M-18) + H	M + H	M + Na	MS-MS
KDN	19	367	385	407	313, 295, 283, 229
Neu5GC	20	424	442	464	313, 295, 283, 229
Neu5Ac	23,5	408	426	448	313, 295, 283, 229, 205

a)



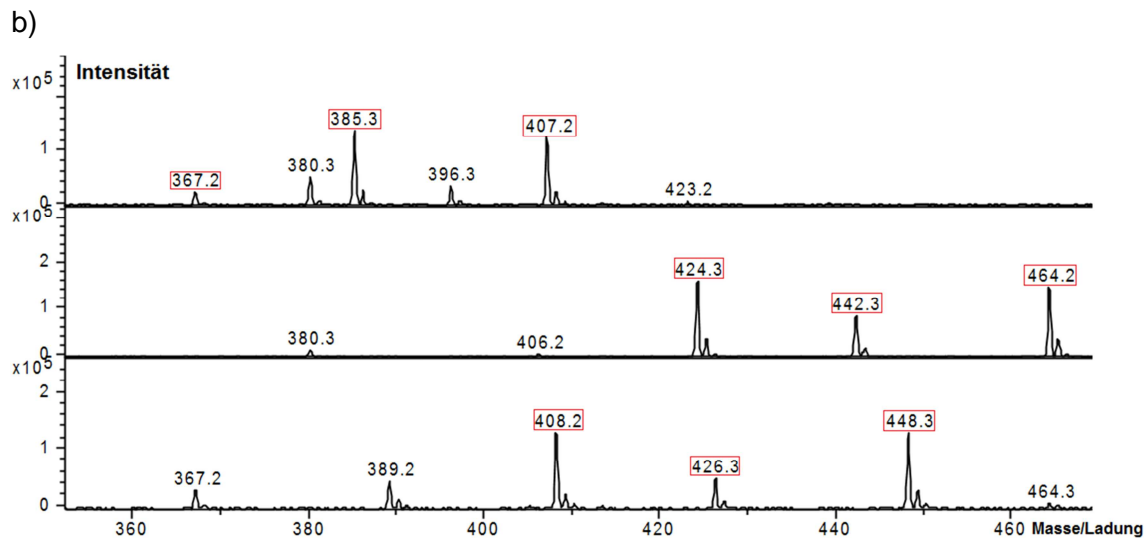


Abb. 24a und b: massenspektrometrische Untersuchung eines Sialinsäure-Standards; zugehöriges HPLC-Chromatogramm oben und ESI-Massenspektrogramm unten; Das Chromatogramm zeigt die drei *Peaks* des Sialinsäure-Standards mit KDN, Neu5Gc und Neu5Ac und der jeweiligen Zeit, zu der die *Peaks* ihr Maximum erreichen, also die Konzentration der Stoffe am höchsten ist. Abbildung b ist nun die zugehörige massenspektrometrische Auswertung dieses Chromatogramms mit dem Fokus auf den Zeitfenstern, welche das Chromatogramm angezeigt hat und wo die zu suchenden Massen (siehe Tab.6): 367, 385, 407 für KDN; 424, 442, 464 für Neu5Gc und 408, 426, 448 für Neu5Ac zu erwarten sind. Man sieht, dass die jeweils zu erwartenden Massen zur jeweiligen Zeit (rote Kästen) mit einer hohen Intensität (10^5 Moleküle) erscheinen, was deren Anwesenheit zweifelsfrei bestätigt.

Alle diese dargestellten Abläufe und Probenaufbereitungen erfolgen innerhalb von 1-2 Tagen. Es werden direkt anschließend in der HPLC und dem ESI-MS die vorbereiteten Proben untersucht, da die Markierung mittels DMB nur für eine geringe Zeit funktioniert, weil DMB sich nach und nach zersetzt und es so zu Verfälschungen des Ergebnisses kommen kann. Auch tiefgekühlt ist es schwierig mit DMB markierte Moleküle längerfristig (für Wochen) vor der Analysedurchführung aufzubewahren. Muss man zwischen Probengewinnung und Analyse eine Pause machen, so empfiehlt es sich diese direkt nach der Probengewinnung tiefgekühlt im Eppendorff SafeLock-Röhrchen aufzubewahren.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung und Versuchsgewebe:

Bereits seit fast 30 Jahren wird die DMB-HPLC-Methode genutzt, um Sialinsäuren zu quantifizieren (Hara et al., 1987). Stand heute ist diese Methode eine der leistungsstärksten, um den Status der Sialylierung von Zellen zu untersuchen. Dies liegt vor allem daran, dass a) schon kleinste Mengen Probenmaterial im fmol Bereich ausreichen, b) keine vorherige Proben-Aufreinigung erforderlich ist, c) hierdurch ein hoher Probendurchsatz gewährleistet werden kann und d) eine Kombination mit MS-Techniken möglich ist (Galuska, 2012). Bisher wurden die meisten Studien mit dieser Methode mit Homogenisaten von Geweben durchgeführt, was bei der Untersuchung des Sialylierungsstatus zu nicht zell-, sondern nur organ- oder gewebespezifischen Ergebnissen führte. Die Morphologie der Gewebe bei der Analyse zu erhalten ist wichtig, wenn man den Sialylierungsstatus ausgesuchter Zellen und Zellpopulationen ermitteln möchte. Das Mittel der Wahl, gezielt Zellpopulationen zu isolieren, stellt die *Laser Capture Microdissection* dar.

Für die Entwicklung eines effizienten und reproduzierbaren Arbeitsablaufs für die beschriebene Kombination aus Laser Capture Microdissection und DMB-HPLC-MS Analyse wurden verschiedenen Gewebetypen von Mäusen untersucht.

4.2 Entwicklung der Analysenstrategie mit Hoden und Nebenhoden aus der Maus

4.2.1 Generelle Prüfung einer Kombination der LCM- und DMB-HPLC-MS-Anwendungen

Die ersten Versuche, welche die Möglichkeit der Kombinierung von *Laser Capture Microdissection* mit DMB-HPLC-ESI-MS Sialinsäure-Analyse eruieren sollten, wurden mit Formalin fixierten in Paraffin eingebetteten Hoden- und Nebenhodengewebe von Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden Gewebsschnitte auf membranbespannte Objektträger befestigt, deparaffiniert, rehydriert und luftgetrocknet. Anschließend isolierte man ausschließlich apikal gelegene Zellen mittels Laser (siehe Abb. 26a). Diese gewonnenen Zellbereiche wurden, wie bereits im Material- und Methodenteil dargelegt, in Zeiss AdhesiveCaps aufgefangen und anschließend in ein 2 ml SafeLock-Eppendorff-Röhrchen transferiert und analysiert.

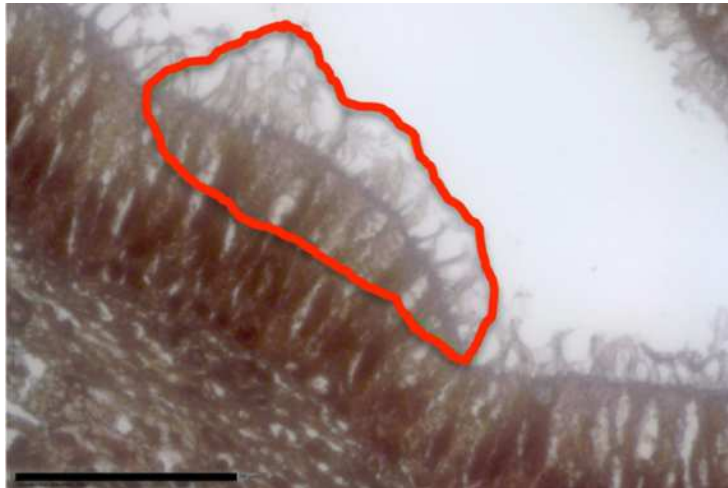


Abb. 25a: Der rot markierte Abschnitt des Bildes zeigt den ersten Schritt der Analyse des Sialylierungsstatus der apikalen Epithelzellregion eines Maus Nebenhoden Areals inklusive der Zilien. Dieser Abschnitt wurde per Software ausgewählt und damit für den Laser zur Entfernung vorbereitet. Die Mäuse Nebenhoden, die hier verwendet wurden, waren in Paraffin eingebettet und wurden vor der Markierung und anschließenden Extraktion wie beschrieben gefärbt und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet (Die Isolation der in Abb. 25a dargestellten apikalen Regionen wurde von Frau Caroline Feuerstacke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Middendorff durchgeführt (JLU Gießen)(Abb. 25b aus Bartel et al., 2014)).

Circa 290 Zellen wurden pro Probe auf diese Weise entfernt und in einem Zeiss AdhesiveCap aufgefangen und gesammelt. So wurden mehrere Proben gewonnen. Die Haftung der ausgeschnittenen Zellen am Deckel wurde nach jedem Extraktionsvorgang visuell kontrolliert. Dies ist von enormer Wichtigkeit, da immer das Risiko besteht, dass Zellen nach dem Katapultieren durch den Laser nicht wie gewünscht am Cap haften bleiben und zurück auf den Objektträger fallen.

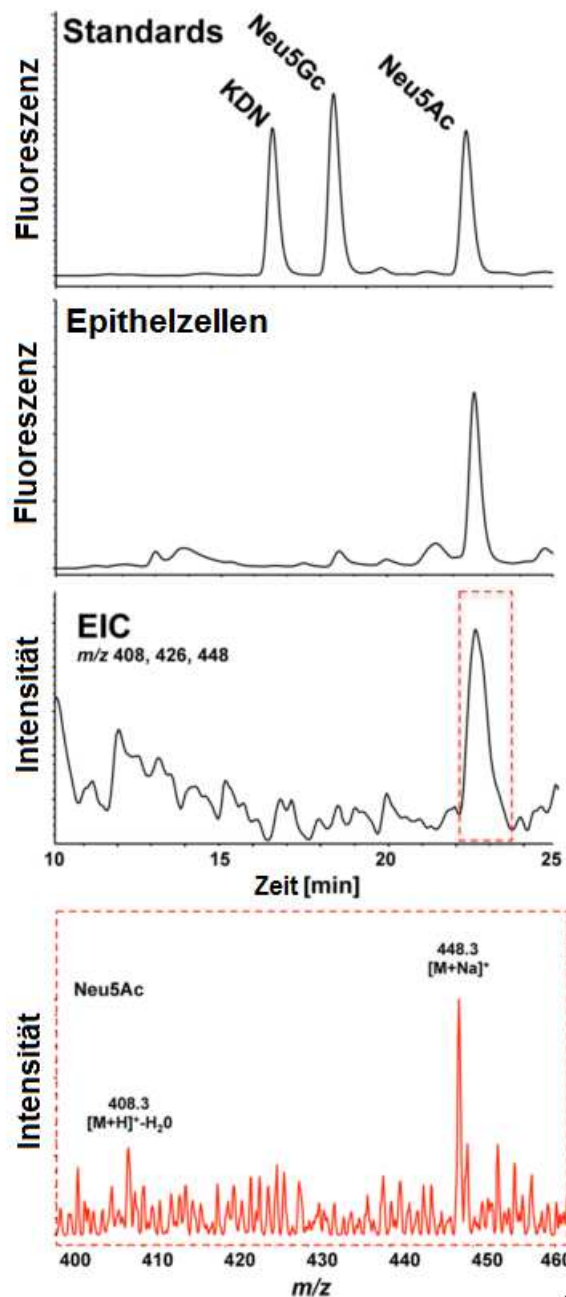


Abb. 25b: Hier wird die nachfolgende Analyse des Maus Nebenhoden Gewebes des in Abbildung 25a gezeigten Beispiel-Ausschnittes und anderer nach Extraktion dargestellt. Nachdem die Proben hydrolysiert und mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DMB markiert wurden, erfolgte die Separierung per RP-HPLC (Bildabschnitt 1 und 2). Das „*Extracted Ion Chromatogram*“ (EIC) (Bildabschnitt 3) zeigt die DMB-Neu5Ac Addukte bei m/z 408, 426 und 448, welche im ESI-MS-Spektrum während dieser Zeit (Bildabschnitt 4) aufgezeichnet wurden. Alle folgenden Anwendungen der *Laser Capture Microdissection*-Methode wurden von mir durchgeführt (Abb.25a und b aus Bartel et al., 2014; modifiziert).

Die DMB-HPLC-Analysen der Proben resultierte in Signalstärken, um eine eindeutige Aussage über Vorhandensein von Neu5Ac treffen zu können (siehe Abb. 25b und 26). Es war nicht nur bei der Retentionszeit von Neu5Ac ein deutliches Fluoreszenzsignal detektierbar. Dass es sich wirklich um Neu5Ac handelt, konnte mittels ESI-MS-Analyse und Signalen bei m/z 408, 426 und 448 bestimmt werden (Abb. 26b). Typisch ist dabei, dass nur bei Natrium-Addukten kein Verlust von H_2O zu beobachten ist.

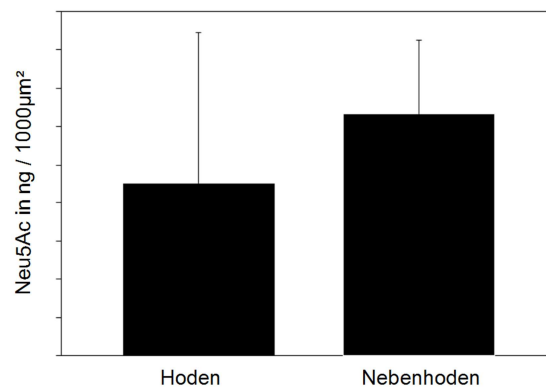


Abb. 26: Quantifizierung der HPLC Analyse von Neu5Ac in Maus Hoden und Nebenhoden nach Extraktion der Zielgebiete. Die Darstellung zeigt die Mengen an Neu5Ac bei Maus Nebenhodenproben und Maus Hodenproben, welche auf ng pro 1000µm² ausgeschnittener Fläche Epithelzellen bezogen wurden (Probenmenge n=8).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Kombination beider Methoden möglich ist, sollte in den folgenden Versuchen der Arbeitsablauf optimiert werden.

4.2.2 Capture Device Test

Zwei Varianten von Auffangbehältnissen wurden untersucht, um eventuelle Qualitäts-Unterschiede festzustellen, Mineralöl-Deckel und AdhesiveCaps. Das verwendete Gewebe war Maus Hoden. Dieser Test ergab, dass der Methodenhintergrund mit Mineralöl als Haftmittel im Deckel der Probengefäße größer war, als bei den speziell vorgefertigten Röhrchen der Firma Zeiss mit AdhesiveCap. Des Weiteren war die absolute Ausbeute bei den AdhesiveCaps höher als bei den Mineral-Öl-Deckeln (Abb. 27).

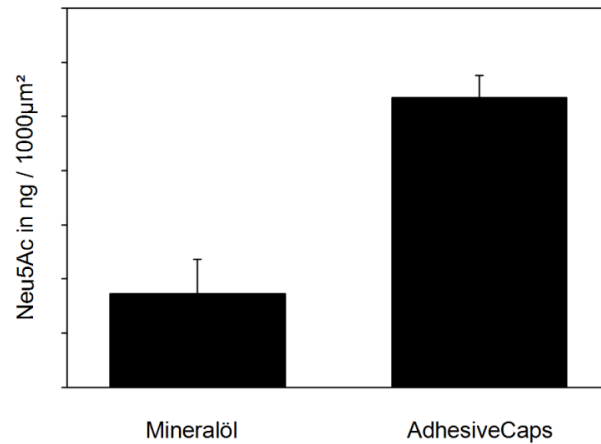


Abb. 27: Hier ist die quantitative Auswertung des Vergleichs der Neu5Ac-Signale von Mineralöl beschichteten 0,5 ml Eppendorff-Röhrchen Deckeln mit Zeiss *AdhesiveCap*-Deckeln dargestellt. Beide Proben wurden mit gleicher Probenmenge durchgeführt (Probengefäße n=5).

Ein weiteres Problem des Mineralöls als Haftvermittler war zudem die zeitliche Begrenzung für die Auswahl geeigneter Areale zum Extrahieren, da es zur Tropfenbildung durch die Hitze der Halogenbeleuchtung der Objektträger kommen konnte (siehe Abb. 11 und 12 Kapitel 3.2.1.3). Diese Tropfenbildung kann zur Beschädigung oder Verunreinigung der Objektträger führen und bereits katapultierte Ausschnitte mit sich reißen und somit wieder aus dem Deckel entfernen. Des Weiteren wäre eine Analyse der Proben mittels Massenspektrometrie und/oder Gaschromatographie, welches in nachfolgenden Versuchen erfolgen könnte, ausgeschlossen gewesen durch die Hintergrundbelastung des Öls selbst. Letztendlich stellte es sich auch unter praktischen Gesichtspunkten als besser heraus, vorproduzierte normierte Fertigprodukte zu verwenden als diese selbst herzustellen, um nicht weitere Variablen in die Methode einzubringen.

4.2.3 Färbetests Maus Hoden und Nebenhoden

Es wurden 2 Versuche durchgeführt, um zu bestimmen, ob es einen signifikanten Einfluss hat, welche Färbemethode verwendet wird bzw. ob eine Färbung angewendet wird. Vor allem für die Auszählung von Zellen machte es bei unseren Untersuchungen Sinn, dass man die Zellkerne eindeutig erkennen und damit zählen kann, um die gefundenen Mengen der Neu5Ac mit der Menge an Zellen korrelieren zu können, um letztendlich quantitative Aussagen treffen zu können. Eine Färbung der Zellen darf jedoch nicht dazu führen, dass sich die Ausbeute an Neu5Ac im Vergleich zu ungefärbten Schnitten verändert. Zu diesem Zweck wurden diese drei verschiedenen Färbprotokolle angewendet und verglichen: Hämatoxylin-Eosin, ohne Färbemittel und Hämalaun.

Diese Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Färbevarianten (siehe Abb. 28).

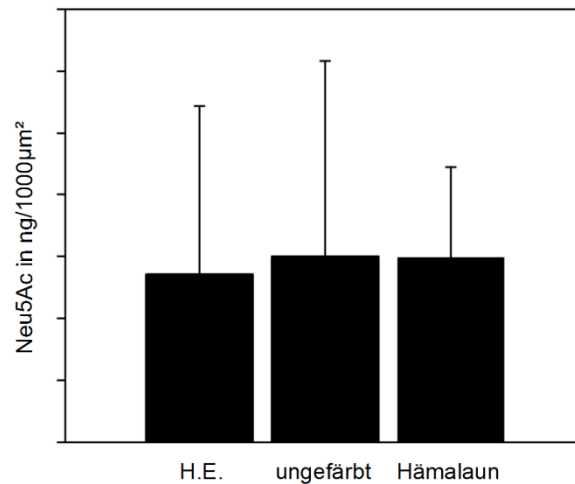
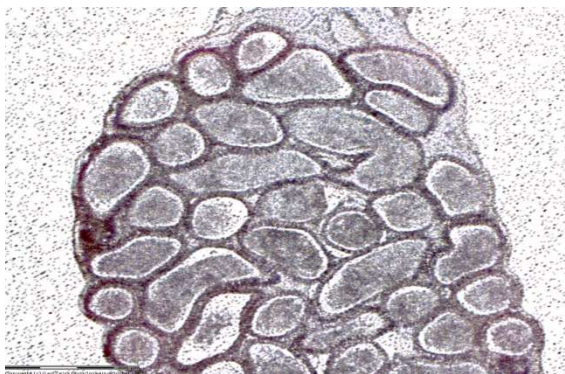


Abb. 28: Maus Nebenhoden LCM Versuch 3 und 4 Färbetests kombiniert. Verschiedene Färbemethoden wurden angewendet und verglichen: Hämatoxylin-Eosin, ungefärbt und eine reine Häkalaun-Färbung. Anschließend wurden Zellen von Maus Hoden und Nebenhoden entweder ausschließlich aus dem Lumen entnommen oder ausschließlich aus dem das Lumen umgebenden Gewebe, sprich die angrenzenden Epithelzellen (Probenmenge n=8).

So wurde die Häkalaunfärbung gewählt, aufgrund der sehr einfachen Anwendung und guten visuellen Darstellung der Gewebe und vor allem der Zellkerne (siehe Abb. 29a und b).

a)



b)

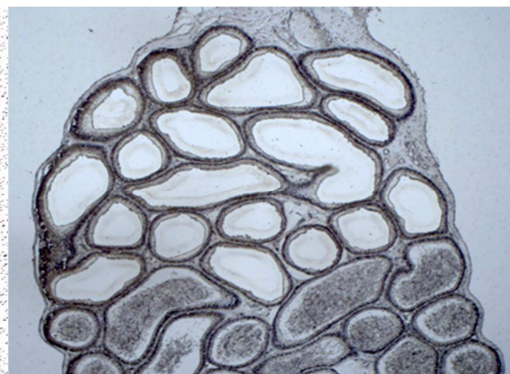


Abb. 29a und b: LCM Versuch 3 Maus Nebenhoden vor Extraktion (links) und nach Extraktion (rechts) in einer 5-fachen Vergrößerung als Übersichtsaufnahme zur Kontrolle des Extraktionsergebnisses.

Vor allem der Ausschluss einer Beeinträchtigung des Versuchsergebnisses durch die unterschiedlichen Färbemethoden war das Ziel dieser Versuche und konnte bestätigt werden.

4.3 Analyse Sialylierungsstatus Maus Lunge und Reproduzierbarkeit der Methode

Nachdem Maus Hoden- und Nebenhodengewebeuntersuchungen zur Methodenetablierung untersucht wurden, sollte die Methode auf weitere Mäuse Gewebe ausgedehnt werden. Zuerst wurden Lungenschnitte und hier im Besonderen Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen genauer betrachtet.

4.3.1 Maus Lunge Bronchialepithelzellen

Bei den Bronchialepithelzelluntersuchungen wurden keine Zellzahlen definiert, sondern die ausgeschnittene Fläche wurde dokumentiert und in Relation zu den gewonnenen Sialinsäuren gesetzt. Dies war erforderlich, da es hier selbst bei 40-facher Vergrößerung nicht möglich war, exakte Aussagen über die Anzahl der Zellkerne zu machen (siehe Abb. 30)

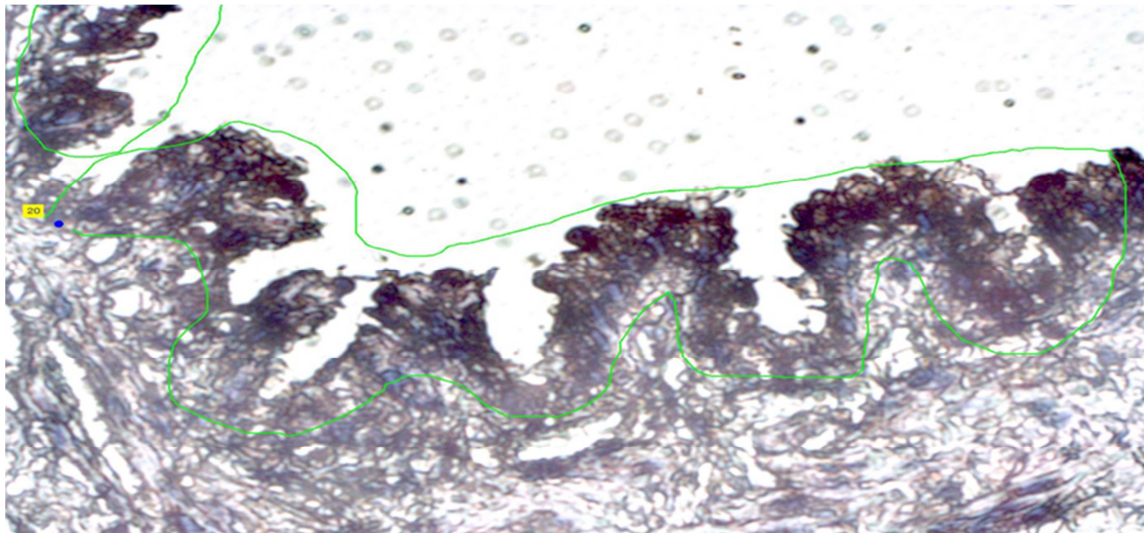


Abb. 30: Mäuse Lungen Bronchialgewebe Epithelzellen grün umrandet vor der Extraktion mit der PalmRobo Software. Die Markierung der Zielgebiete erfolgte manuell mittels Maus-Cursor gesteuerter Linienführung. Das Bild zeigt die angewendete 40-fache Vergrößerung.

Die Gewebeexzisionen waren gut durchzuführen und anschließend auf erfolgreiche Katapultierung zu überprüfen (siehe Abb. 31a). Es wurde auch hier nachweislich Neu5Ac gefunden (siehe Abb. 31b). Insgesamt wurden acht Proben mit Lungengewebe gewonnen und anschließend aufbereitet und untersucht. Die Ergebnisse wiesen eindeutig die Anwesenheit von Neu5Ac in allen Proben nach.

a)



b)

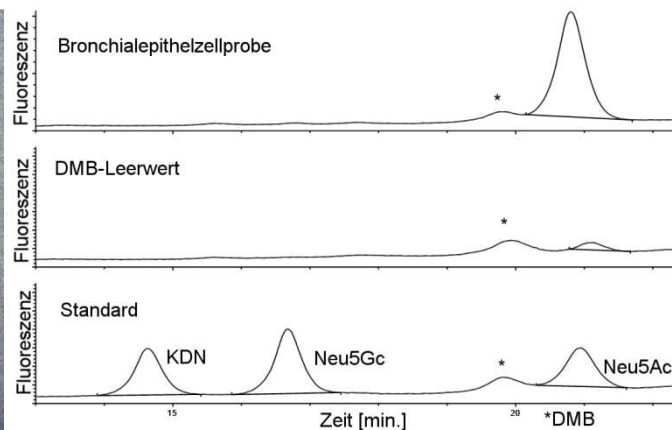


Abb. 31a und b Maus Lunge: a) Zeiss AdhesiveCap Deckel Ausschnitt einer Kontrolle nach Katapultierung von Bronchialepithelzellgewebe. b) Anschließende DMB HPLC-Analyse mit exemplarisch dargestellten Chromatogrammen vom Standard, Leerwert und Bronchialepithelzellproben. Zusätzlich zu den markierten Sialinsäuren erscheint in allen Chromatogrammen ein abgegrenzter Methoden-Peak (DMB, siehe *) (n=8). Dieser Methodenpeak ergibt sich aus der Reaktion des DMB mit dem Puffer und den Methodenreagenzien. Dies wurde mit Hilfe der Leerwertuntersuchung (siehe oben) und anschließender MS-MS-Kontrollen belegt.

4.3.2 Maus Lunge Alveolarzellen

Anschließend wurden alveolare Zellen analysiert. Die Hämalaunfärbung des Alveolargewebes (siehe Abb. 32) ermöglichte hierbei die manuelle Auszählung der Zellkerne (bei 40-facher Vergrößerung). Ein Minimum von 300 Zellen wurde mindestens erreicht und ergab anders als in den Maus Hoden-, Nebenhoden- und Bronchialepithelzellproben Versuchen zwei eindeutige *Peaks* im Chromatogramm. Der eine *Peak* war wie zuvor Neu5Ac, der zweite *Peak* jedoch zeigte erstmals Neu5Gc, wobei dieser minimal größer war bei den Versuchen als Neu5Ac (siehe Abb. 33). Zusätzlich war jedoch bei dieser Versuchsreihe wie schon bei den Bronchialepithelzellanalysen ein relativ starker Methodenpeak zu sehen, der jedoch scharf abgegrenzt war von Neu5Ac und Neu5Gc (Bartel et al., 2014).

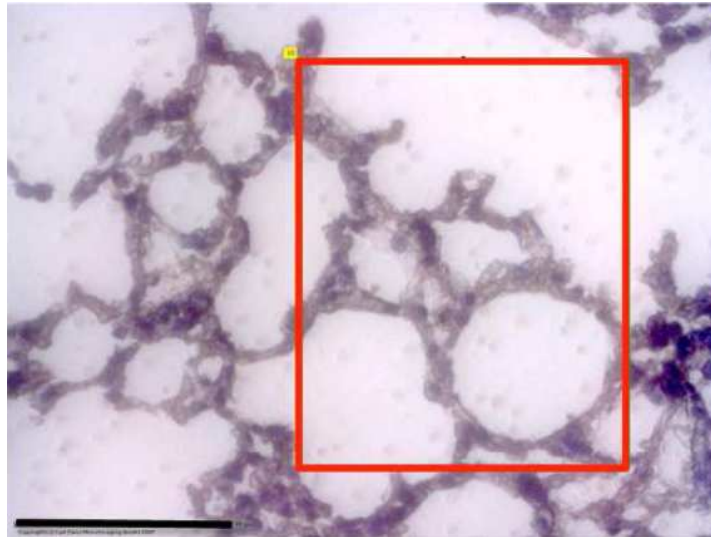


Abb. 32: Maus Lunge Kontrollbild nach händisch gesteuerter rechteckiger Markierung der zu extrahierenden Alveolarbereiche in 40-facher Vergrößerung, Hämalaun-gefärbt.

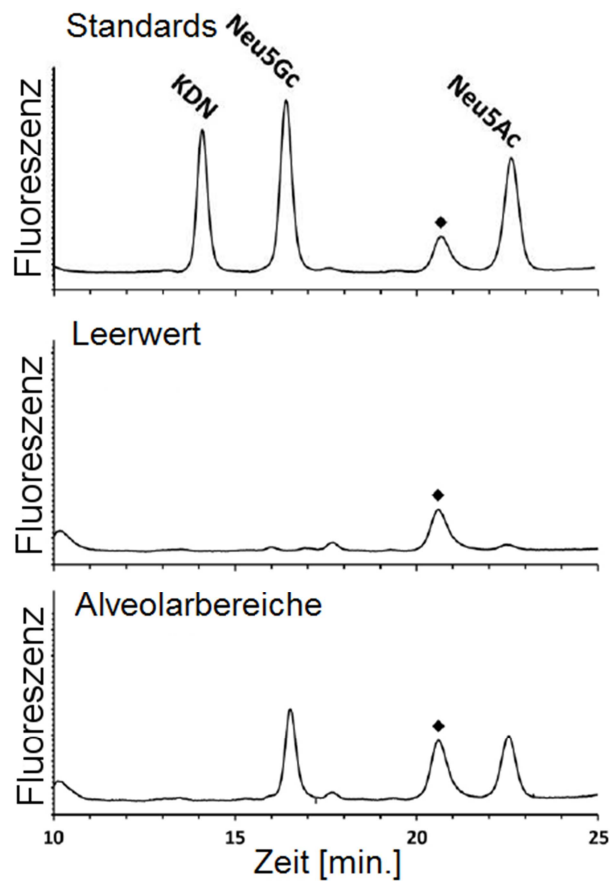


Abb. 33: Maus Lunge Alveolarbereiche DMB HPLC Analyse von Sialinsäuren. Methodenbedingte Signale sind mit einem ♦ markiert (Abb. aus Bartel et al., 2014).

Die quantitative Auswertung aller Proben ist in Abbildung 34 dargestellt.

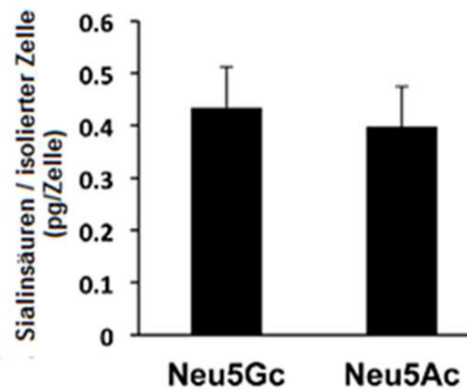


Abb. 34: Auswertung Alveolarproben DMB-HPLC-Analyse. Die Balkendiagramme inklusive der angezeigten Abweichungen demonstrieren, dass sich die im Schnitt gefundene Menge Neu5Ac zu Neu5Gc in pg pro Zelle in etwa die Waage hielten (n=5) (Abb. aus Bartel et al., 2014; modifiziert).

Als Ergebnis der Maus Lungenversuche lässt sich festhalten, dass es möglich ist weitere Gewebe mit dieser Methode reproduzierbar zu untersuchen. Es ist zudem zu erwähnen, dass nur bei den alveolaren Proben Neu5Gc Mengen gefunden wurden und nicht bei den Bronchialproben.

4.4. Vergleich des Neu5Ac-Gehalts transgener CMAS-negativer Mäuse Nieren (Unfähigkeit der Sialylierung von Podocalyxin und Nephryn) mit Wildtyp Nieren

Um die Fähigkeiten der Methode nochmals zu untersuchen und um eine mögliche Verbesserung gegenüber Kompletorganlysaten zu demonstrieren, analysierten wir den Neu5Ac-Gehalt von Glomeruli bereits getesteter Nieren von Wildtyp Mäusen und Mäusen, die einen Defekt der CMP-Sialidasesäure-Synthetase (CMAS) aufwiesen. CMAS ist ein Enzym, das die Reaktion zur Aktivierung der Sialinsäure zu CMP-Sialinsäure im Kern katalysiert. Die CMP-Aktivierung ist essentiell, da einzig aktivierte Monosaccharide vom Nucleus zum Golgi-Apparat transportiert und anschließend auf entstehende Glykokonjugate übertragen werden können. Mäuse, die die sogenannte CMAS^{nls} Punktmutation aufweisen, sterben an Nierenversagen ausgelöst durch eine geschädigte Podozytenreifung (Weinhold et al., 2012). Western Blot Analysen zeigten, dass zwei wichtige Podozyten Proteine, Podocalyxin und Nephryn, hyposialyliert in CMAS^{nls} Mutanten vorhanden sind, wohingegen die Sialylierung anderer Glykoproteine (zum Beispiel β -Integrin) unbeeinflusst geblieben sind (Weinhold et al., 2012). Versuche, die beeinträchtigte Sialylierung mittels DMB-HPLC-Kompletorganlysaten-Analysen mit Gewebekomplexen zu analysieren, zeigten keine Unterschiede (Weinhold et al., 2012). Um nun herauszufinden, ob die bereits beobachtete Hyposialylierung von Nephryn und Podocalyxin auch mit dem bisher angewandten

Arbeitsablauf aufgezeigt werden kann, isolierte ich Glomeruli von Wildtyp Mäusen und von Mutanten mittels *Laser Microdissection*. Der Methodenpeak in den Chromatogrammen ist im Vergleich zum Probenpeak der Glomeruli und im Vergleich zum Methodenpeak bei den Maus Lungengewebebeben sehr gering und ebenfalls scharf abgegrenzt. (siehe Abb. 35 A und B).

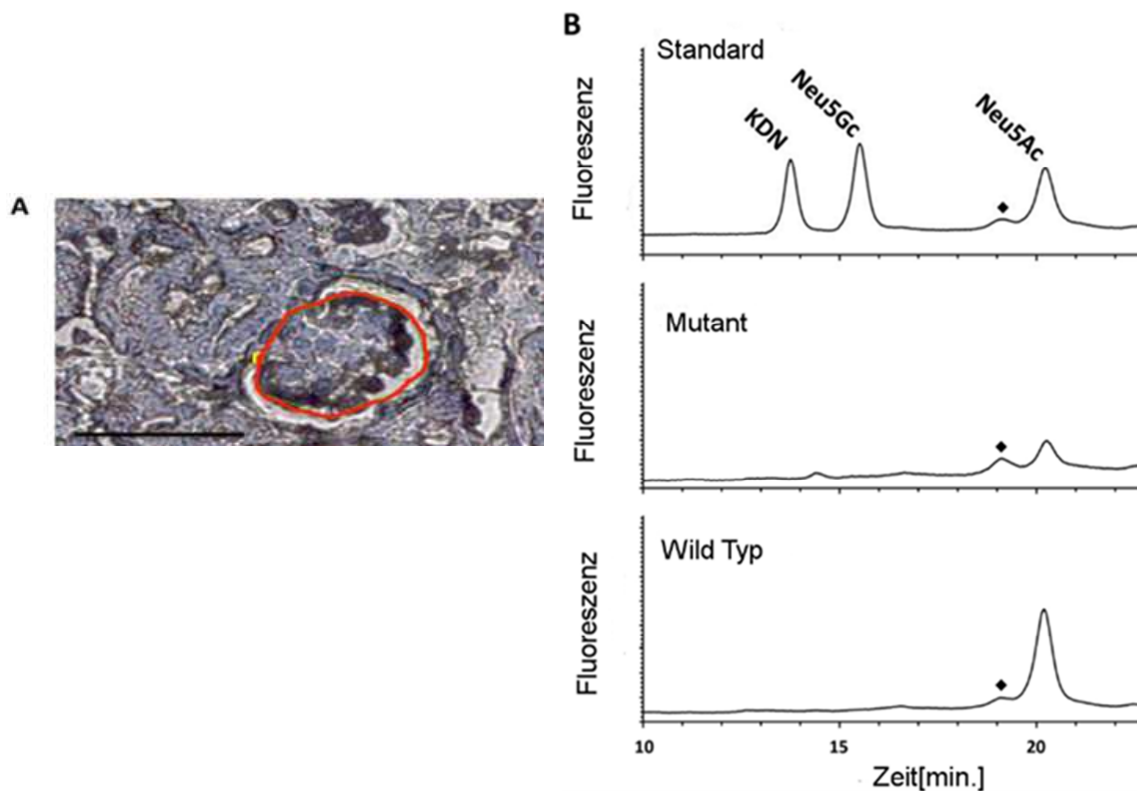


Abb. 35 A) zeigt ein Beispiel für ein Maus Niere Glomeruli, dass mit Hämalaun-Lösung gefärbt wurde bei einer 40-fachen Vergrößerung vor dem Extraktionsprozess. Der Glomeruli ist rot umrandet, welches mittels *Cursor* gesteuerter Linienführung händisch durchgeführt wurde. Die zu erkennende Unschärfe ist auf die Membran zurückzuführen, auf der die Gewebeschnitte aufgebracht sind. Abb. 35 B) zeigt die resultierenden Chromatogramme. Es sind scharf abgegrenzte Signale zu sehen. Methodenbedingte Signale sind mit einem ♦ markiert (Abb. aus Bartel et al., 2014; modifiziert).

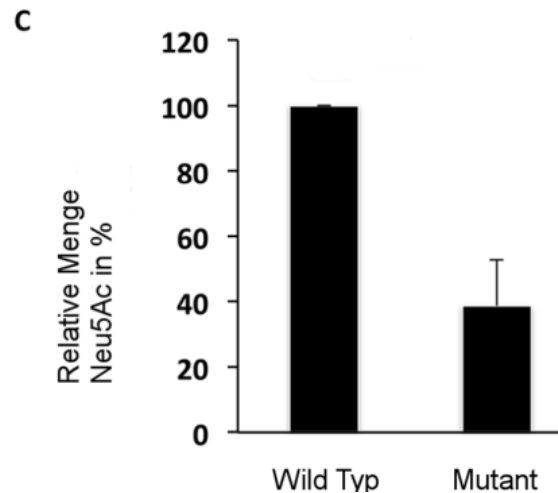


Abb. 36 Der hier grafisch dargestellte Vergleich der respektiven *Peak*-Flächen, die in Abb. 35 B) auszugsweise zu sehen sind, zeigte eine signifikante Reduzierung der Neu5Ac-Spiegel bei den Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (n=3). Die Höhe der Signifikanz ist als $p < 5\%$ klassifiziert (Abb. aus Bartel et al., 2014; modifiziert).

Im Kontrast zu den vor wenigen Jahren erschienen Daten bezüglich der Analyse von Nieren-Komplettorganlysaten (Weinhold et al., 2012) konnte kein mit Neu5Gc korrespondierendes Signal beobachtet werden. Trotzdem konnte mittels dieser spezifischen Analyse der Sialylierungsstatus individueller Glomeruli beschrieben und die Hyposialylierung in CMAS-Mutanten und der besondere Nutzen dieser Methode gezeigt werden.

5. Diskussion

5.1 Diskussionen der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit mit methodischem Fokus wird die Verknüpfung der *Laser Capture Microdissection* Verfahren mit der Analyse durch Fluoreszenz-HPLC und ESI-MS untersucht. Es wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Mäusen aufgearbeitet und auf das Vorkommen von Sialinsäuren, vor allem der Neu5Ac, hin untersucht. Das Ziel war es nicht nur das Zusammenspiel der verschiedenen Methoden zu testen, sondern zugleich durch diese Aneinanderreihung die Möglichkeit zu erwerben, gezielter bestimmte Sialinsäure abhängige Zelldefekte oder Veränderungen an einzelnen Zelltypen oder Zellgruppen zu untersuchen. Gerade die pathologischen Veränderungen in einzelnen Zellen können mit Kompletorganlysaten so nicht untersucht werden, weil die unveränderten Zellen die Ergebnisse dieser überdecken könnten.

5.1.1 Analyse der Durchführung

Bisher beschränkten sich Analysen der Anwesenheit und der Menge von Sialinsäuren auf komplette Organe oder größere Teile von Organen, was die Analyse einzelner Zelltypen in diesem Kontext bisher unmöglich machte. Der hier dargelegte und in den Versuchen entwickelte Methodenaufbau stellt einen hoch-sensitiven und reproduzierbaren Weg dar, der dieses Problem löst, weil mittels *Laser Capture Microdissection* gezielt umschriebene Zellansammlungen und einzelne Zellen isolierbar und anschließend analysierbar sind.

Die dargelegten Ergebnisse der Versuche zeigen, dass es nicht nur möglich ist, sondern auch gut reproduzierbar, die verschiedenen Analyse-Verfahren zu kombinieren. Die ersten Versuche (Maus Hoden) konnten erfolgreich beweisen, dass z. B. eine geringe Probenmenge (ca. 300 Zellen) ausreicht, um ein Fluoreszenzsignal von DMB markierten Sialinsäuren zu erhalten. Des Weiteren war es möglich mittels online LC-MS(/MS) die vorhandenen Sialinsäure unwiderlegbar anhand der Molekülmasse und Fragmentierungsmuster zu identifizieren. Weitere Optimierungen des Methodenablaufs zeigten, dass die reine Hämalaun-Färbung der Schnitte vor der *Laser Microdissection* Isolierung und die Verwendung der AdhesiveCaps die optimalsten Resultate erzielten. Gerade die AdhesiveCaps stellten eine nicht zu unterschätzende Verbesserung der Methode dar, da das Öl in den nicht vorproduzierten Deckeln die Versuchsausbeute in mehreren Belangen verschlechterte. Zum einen bestand immer die Gefahr eines Probenverlustes während eines zu langen

Auschneidevorganges oder einer zu langen Markierungszeit am PC. Dies konnte durch die Hitze der Halogenlampe, die immer möglichst die maximale Leistung bringen muss, um länger haltbar zu sein, da sie bei zu niedrigen Einstellungen schneller verschleißt, geschehen. Letztendlich konnte durch die genannten Gründe die Hitze das Mineral-Öl zum Tropfen bringen und damit zum Verlust geschossener Areale führen. Dies war aber nicht die einzige Beeinträchtigung, die von Öl-Deckeln ausging. Eine weitere essentielle Problematik entwickelte sich bei der Analyse. Während *AdhesiveCaps* durch ihre solide Form relativ gut mit Essigsäure benetzbar waren, ist bei der Öl-Variante immer das Problem vorhanden, dass das Öl möglicherweise der Säure „im Weg“ steht, wenn es um die Benetzung der Proben mit Säure ging. Hierdurch konnte es bei den so gewonnenen Proben bei der Analyse zu einer generell schlechteren Ausbeute kommen, durch eine niedrigere Quantität im Chromatogramm und eine höhere Streuung der Ergebnisse im Generellen, abhängig vom relativen Zufall wie gut die Säure die Proben aus dem Öl löst (siehe 4.2.2).

Aufgrund der langwierigen Isolationsprozedur handelt es sich bei dem beschriebenen Versuchsablauf nicht um ein Hochdurchsatzverfahren. Nach dem *Laser Microdissection* Verfahren ist es möglich einen hohen Durchsatz an Proben zu fahren, da sie in einem Autosampler problemlos über Nacht analysiert werden können. Wenn man es noch durch höhere Drücke an der HPLC ermöglicht, kürzere Säulen zu verwenden, ist es möglich die Analysen in der HPLC selbst bei solch großen Probenmengen (>24) alle in unter einem Tag durchzuführen.

5.1.2 Alleinstellung der Methode

Die großen Vorteile des entwickelten Versuchsaufbaus konnten eindrucksvoll bei der Analyse von CMAS-Mutanten gezeigt werden. Bei Western Blot Versuchen gegen Podocalyxin und Nephlin wurde festgestellt, dass es bei diesen beiden Glykoproteinen nicht zur Sialylierung kommt, was zu schweren Nierendefekten während der Organogenese führt. Dies war zudem ausschließlich auf das Glomerulum beschränkt (Weinhold et al., 2012). Alle anderen Glykoproteine zeigten hingegen einen unveränderten Sialylierungsstatus. Die vorangegangenen DMB-HPLC-Analysen von kompletten Nierenlysaten konnten dies nicht zeigen und man benötigte lange, um diese glykoproteinspezifische Hyposialylierung aufzudecken (Weinhold et al., 2012). Mit dem neuen Analyseverfahren konnte man hingegen nach der Isolation der Glomeruli signifikante Unterschiede im Sialylierungsstatus zeigen, was den Projektverlauf von Weinhold et al. enorm beschleunigt hätte.

Dieses Anwendungsbeispiel lässt weitere Verwendungs-Möglichkeiten der Methode sinnvoll erscheinen. Zum Beispiel die Untersuchung von Tumorgewebe, bei der man gezielt den Sialylierungsstatus untersuchen kann. Durch die genaue Lokalisierung und Analyse der vorhandenen Sialinsäuren könnten so Unterschiede zwischen gesunden Zellverbänden und pathologisch veränderten Zellen gefunden werden, die eine genaue Typisierung des Tumors zulassen. Komplettorganlysate können diese Bedingung nicht erfüllen, da zu viele „Beimischungen“ die Ergebnisse verunreinigen. Die *Laser Capture Microdissection* macht es möglich mit entsprechender mikroskopischer Auflösung Zellen einzeln auszuschneiden, das heißt es ist machbar eine glatte Trennlinie zwischen gesundem und verändertem Gewebe beim Ausschneidevorgang zu wählen.

5.2 Limitierungen der Methode

So groß die Vorteile sind, die der beschriebenen Methodenablaufs bietet, so müssen viele Punkte mit allerhöchster Präzision durchgeführt werden und Kontrollen sind unabdingbar. Die erste mögliche Fehlerquelle bei diesem Verfahren besteht in der nicht sorgfältigen Einstellung der Lasergenauigkeit. Wenn man nicht vor jeder Versuchsreihe die Kalibrierung des Lasers durchführt und testet, kann es passieren, dass die angegebenen Areale verfehlt werden und man nicht mehr exakt Zellen und Zellverbände ausschneiden kann.

Auch macht es der notwendige Verzicht auf die Eindeckelung der Proben bei bestimmten Zell- und Gewebetypen die visuelle Identifikation schwierig, da beim Trocknen der Zellen ihre Morphologie verändert wird. Nach der Katapultierung der Areale ist es von größter Wichtigkeit zu kontrollieren, ob man alle oder nur einen Teil der geschossenen Gebiete auch im AdhesiveCap wiederfindet. Entsprechende Verluste sind zu vermerken, da sie sonst zu verfälschten Ergebnissen führen. Bei qualitativen Analysen ist dies bedingt von großer Bedeutung, jedoch für eine Quantifizierung unabdingbar.

Des Weiteren ergeben sich Schwierigkeiten der Methode im Aufbereitungsteil der Analyse. Im ersten Schritt wird in ein SafeLock Eppendorf-Gefäß mit dem AdhesiveCap-Deckel darin Essigsäure eingefüllt. Hierbei können sich Luftblasen zwischen die Säure und das Cap setzen und so die Benetzung und die Ablösung der Zellen bzw. Zellverbände behindern. Auch die ungleichmäßige Benetzung im Vergleich zu den anderen Proben-SafeLock-Gefäßen verfälscht die Ergebnisse. Gerade beim Vergleich zwischen unveränderten Zellen und ihrem veränderten Pendant, aber auch generell, führt solch ein Fehler zu wenig belastbaren eventuell sogar komplett verfälschten Ergebnissen. Die nächste Stelle an der Ungenauigkeiten entstehen

können, ist der Übergang von den SafeLock-Eppendorff-Röhrchen in die Glas-Vials. Beim Umsetzen ist es eminent wichtig eine exakt gleiche Menge an Flüssigkeit bei allen Proben umzusetzen, um hier keine Messungenauigkeiten schon vor der Analyse zu erzeugen.

Sind alle Schritte der Analysevorbereitung abgeschlossen, geht es an den Lauf der Proben in der HPLC. Hierbei ist es wichtig, dass man eventuelle Ungleichheiten, die im Laufe eines kompletten Durchlaufs aller Proben durch die HPLC entstehen können, aufdeckt und abfängt. Zum Beispiel kann es bei hohen Mengen an Zielmolekülen zur Verschiebung der Retentionszeit von Analyten während eines Durchlaufes kommen, durch Überladung an der Trennsäule. Um dies identifizierbar und korrigierbar zu machen, ist es nötig die Abfolge der Proben und der Standards abzuwechseln, so dass man anhand der Vergleiche der Standardchromatogramme miteinander diese Verschiebung erkennen kann. Letztendlich kann man anhand der ESI-MS-Daten trotz solch einer Eventualität noch eindeutige Aussagen anhand der Molekülmasse treffen. Besonders wichtig ist es bei quantitativen Analysen mit einem Fluoreszenzmarker wie DMB die Zeit zwischen der Derivatisierung und HPLC-Analyse unter 48 h zu halten, da mit der Zeit das Fluoreszenzsignal abnimmt und so die Ergebnisse verfälscht, wenn es zu lange dauert alle Proben zu fahren. Dies begrenzt die Probenmenge, da diese alle an einem Tag den Durchlauf durch die HPLC absolviert haben müssen.

Abschließend bleibt noch festzuhalten, dass auch die Anzahl der Zellen, die man extrahieren muss, um vernünftige Ergebnisse zu erhalten natürlich stark abhängig davon ist, wie häufig das nachzuweisende Molekül (hier die Sialinsäurespezies) im untersuchten Gewebe vorkommt. Die Neu5Ac kommt bekanntermaßen in größeren Mengen im Gewebe vor als Neu5Gc und andere. Dies führt wiederum zu einem geringeren Bedarf an Probenmaterial und damit ausgeschnittenen Zellen. Z. B. führt dies im Umkehrschluss zur Problematik, dass man für diese anderen Sialinsäurespezies ein Vielfaches an Probenmaterial benötigen könnte um die Analyseschwelle zu überschreiten.

Trotz der dargelegten kritischen Punkte, die stetiger Kontrolle bedürfen, zeigen die dargelegten Ergebnisse der Versuchsreihen, dass die neuentwickelte Analysestrategie ein vielfältig einsetzbares Werkzeug sein kann. Möglichen Ungenauigkeiten, die bei der Durchführung entstehen könnten, ist durch gewissenhaftes Arbeiten und Kontrollschritten entgegenzuwirken, um eine robuste, gezielte und auf wenige Zellen oder Zellverbände beschränkte aussagekräftige Sialinsäure-Analytik durchzuführen. Sie soll es ermöglichen neue Erkenntnisse zu liefern, welche aktuelle Methoden bisher nicht liefern konnten. Sie könnte zum Beispiel verwendet werden, um im

Zusammenspiel mit klinischen Befunden menschliche Gewebeproben (zum Beispiel Biopsien) zu untersuchen. Dies würde ermöglichen neue Erkenntnisse auf dem Gebiet von Sialinsäure-abhängigen Prozessen während pathologischer Ereignisse zu machen und eventuell neue Biomarker zu bestimmen.

6. Ausblick

Auch wenn das Verfahren bereits anwendbar ist (Bartel et al., 2014), sind noch zahlreiche Verbesserungen denkbar. Weitere Verbesserungen der Analysestrategie wären zum Beispiel die Möglichkeit anstatt einer einfachen Färbung eine Antikörper-Färbung zu verwenden, um die Zielregionen im Voraus besser festlegen zu können und verifizierbarer zu machen. Bei Genanalysen ist dies bereits erfolgreich durchgeführt worden (Fend et al., 1999)(Fend et al., 2000). Eine weitere Optimierung stellt die automatisierte Extraktion von Antikörper-markierten Zellen dar, bei der anhand des Farbkontrastes eine Software automatisch Zellen auswählt und isoliert (Eberle et al., 2010). Jedoch musste bisher für eine Software-gestützte Markierung der Kontrast relativ groß sein, damit eine eindeutige Unterscheidung von gesuchtem Zellmaterial und unerwünschten Beiwerk möglich war. Aber mittels neuerer Mustererkennung für histologische Proben (Hipp et al., 2011) ist es nun möglich den zeitintensiven Ablauf der manuellen Auswahl gesuchter Zellen und Geweben in Zukunft stark zu reduzieren und dieses Nadelöhr der Methode weit aufzustoßen (Hipp et al., 2011). Der große Vorteil hiervon liegt klar auf der Hand: extreme Zeitersparnis, wegen semi-automatisierter Auswahl der Proben und Kontrolle der Extraktionen. Anhand der DMB-HPLC-MS(/MS)-Analyse ist es sogar möglich nicht nur mengenmäßige Differenzen zu erhalten sondern auch bestimmte Molekülveränderungen selbst festzustellen, wie zum Beispiel zusätzliche Substituenten (z.B. eine Acetylgruppe). Des Weiteren ist es natürlich möglich andere Fluoreszenzmarker in die Methode einzubauen, wenn man andere Zuckermoleküle oder komplette Glykane untersuchen will. Wichtig hierfür ist jedoch, dass die Selektivität der Marker entsprechend hoch ist und dass man im ESI-MS die Signale der HPLC überprüfen kann.

7. Zusammenfassung

Sialinsäuren haben mannigfaltige Bedeutungen für den menschlichen Körper. Sie regulieren z.B. Wachstumsprozesse während der Embryogenese, aber sie stehen auch im Zusammenhang mit Tumorwachstum und –migration. Bis heute ist es bei Analysen, die die Anwesenheit und die Menge von verschiedenen Sialinsäurespezies betreffen, unumgänglich Kompletorganlysate oder größere Organteile zu verwenden, welche dadurch eine Mischung von verschiedenen Zelltypen beinhalten. Hierdurch ist es nicht oder nur sehr schwierig möglich den Sialylierungsstatus eines genau definierten Bereiches in einem Organ und/oder einem bestimmten Zelltypen zu ermitteln.

Die in dieser Arbeit entwickelte Analysestrategie ermöglicht einen hoch sensitiven und reproduzierbaren Weg, um diese Problem zu lösen. Dies gelingt durch den Einsatz der *Laser Microdissection*, weil sie es erlaubt Analysen gezielt ausgesuchter Bereiche von Zellpopulationen durchzuführen. Verstärkt wird dies durch den Einsatz der DMB-HPLC-ESI-MS Anwendung, welche ein hilfreiches Werkzeug darstellt, für die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von Sialinsäuren. In dieser Kombination sind nicht mehr als 300 Zellen pro Analyse notwendig, um die häufigste Sialinsäurespezies Neu5Ac zu identifizieren. Sollen jedoch andere seltenere Sialinsäurespezies isoliert werden, müssen wohl deutlich mehr Zellen extrahiert werden, je nachdem wie hoch die Konzentration dieser im betreffenden Gewebe ist.

Es war mit der etablierten Methode möglich, eine während der Reifung entstandene Verminderung der Sialylierung einer Niere in einem transgenen Mäusemodell zu entdecken, welche sich auf die Glomeruli beschränkte. Im Gegensatz hierzu war es nicht möglich dies mit kompletten Mäuse Nieren Lysaten derselben Versuchsreihe festzustellen (Weinhold et al., 2012).

Die beschriebene Kombination von *Laser Microdissection* von in Paraffin eingebettetem Gewebe mit der verlässlichen als auch hoch sensitiven DMB-HPLC-ESI-MS Anwendung kann des Weiteren dafür verwendet werden menschliche Gewebeproben zu analysieren, welche mit klinischen Untersuchungen verbunden sind (zum Beispiel Biopsien). Da viele Proben als in Paraffin eingebettete Gewebe vorliegen und viele pathologische Prozesse wie zum Beispiel Metastasen mit veränderten Sialinsäure Spiegeln einhergehen, bietet sich dieses an. Die beschriebene Methode könnte zur Entdeckung neuartiger Sialinsäure abhängiger Prozesse während pathologischer Vorgänge führen und eventuell zur Identifizierung von Biomarkern, die mit diesen korrespondieren.

8. Summary

Sialic acids are involved in several biological processes and are discussed to influence e.g. cell growth in embryogenesis and tumor growth as well as tumor migration. So far, analyses regarding the presence and quantities of different sialic acid species were mostly restricted to complete or bigger compartments of organs consisting of a mixture of different cell types. Thus, the exact sialylation status of a defined area and/or a distinct cell type could not be determined.

The methodical approach established in this work provides a highly sensitive and reproducible way to solve this problem, since laser microdissection allows the analysis of defined cell populations. Moreover, online DMB-HPLC-ESI-MS provides a useful tool for the unambiguous identification and quantification of sialic acids. For the detection of the most abundant sialic acid species like Neu5Ac, less than 300 cells are necessary per analysis. However, in the case of sialic acid species existing at exceedingly low quantities, significantly more cells have to be isolated depending on the concentration of the sialic acid residues of interest.

Furthermore, it was possible to detect an impaired sialylation during kidney maturation in a transgenic mouse model, which was restricted to glomeruli. In contrast, no differences were observed using whole kidney lysates (Weinhold et al., 2012).

The described combination of laser microdissection of paraffin embedded tissue with the robust as well as highly sensitive DMB-HPLC-ESI-MS approach could be a useful tool to analyze human tissue samples associated with clinical records (e.g., biopsies) since such samples are prevalently available as paraffin embedded tissue and a lot of pathological processes like metastasis are discussed to come along with changed sialic acid levels. Thus, the outlined strategy may allow the discovery of novel sialic acid dependent mechanisms during pathological events and possibly also the identification of sialic acids as novel biomarkers.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Privatdozent Dr. Sebastian Galuska, für das interessante Thema meiner Arbeit und die herausragende Betreuung während des gesamten Zeitraums. Sein Enthusiasmus war mir stets ein Vorbild und Motivation.

Prof. Dr. Rudolf Geyer danke ich für meine initiale Aufnahme als Doktorand und Teil der ehemaligen Arbeitsgruppe Geyer.

Großen Dank möchte ich Herrn Werner Mink aussprechen, der mich in nahezu alle Methodenteile und Geräte eingearbeitet hat, die für meine Doktorarbeit vonnöten waren.

Ebenso dankbar bin ich Prof. Middendorff und seiner Arbeitsgruppe im Anatomischen Instituts der Justus Liebig Universität Gießen für die Nutzungserlaubnis und Einarbeitung in die Verwendung des PalmRobo von Zeiss und die Nutzungsmöglichkeiten des großen Fundus an histologischen Präparaten.

Auch Frau Anja Münster-Kühnel von der Universität Hannover spreche ich meinen Dank aus für die Bereitstellung der Maus Nieren Proben.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Christina Ulm, Siegfried Kühnhardt, Sandra Frank, Peter Kaese, Caro Feuerstacke, Peter und Manka.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für das Vertrauen, dass sie in mich setzen und gesetzt haben.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Frau, die während der unzähligen Stunden, die ich mit dieser Arbeit verbracht habe, mich unterstützt hat und mich immer wieder angetrieben hat, bis sie vollendet war. Danke!

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jan Bartel geboren am 13.08.1984 in Bad Nauheim, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel „*Laser Capture Microdissection* in Paraffin eingebetteter Gewebe als Werkzeug zur Bestimmung des Sialylierungsstatus von ausgewählten Zellpopulationen“ selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Quellenverzeichnis

- Aamelfot, M., Dale, O. B., Weli, S. C., Koppang, E. O., Falk, K. (2014). The in situ distribution of glycoprotein-bound 4-O-Acetylated sialic acids in vertebrates. *Glycoconjugate Journal*, 31, 327–335.
- Aminoff, D. (1961). Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *The Biochemical Journal*, 81, 384–392.
- Angata, T., Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical Reviews*, 102, 439–469.
- Bartel, J., Feuerstacke, C., Galuska, C. E., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Münster-Kühnel, A., Middendorff, R., Galuska, S. P. (2014). Laser Microdissection of paraffin embedded tissue as a tool to estimate the sialylation status of selected cell populations. *Analytical Chemistry*, 86, 2326–2331.
- Bayer, N. B., Schubert, U., Sentürk, Z., Rudloff, S., Frank, S., Hausmann, H., Geyer, H., Geyer, R., Preissner K.T., Galuska, S. P. (2013). Artificial and natural sialic acid precursors influence the angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells. *Molecules*, 18, 2571–2586.
- Crespo, H. J., Lau, J. T., Videira, P. A. (2013). Dendritic cells : a spot on sialic acid, *Frontiers in Immunology*, 4, 1–15.
- Du, J., Meledeo, M. A., Wang, Z., Khanna, H. S., Paruchuri, V. D. P., Yarema, K. J. (2009). Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. *Glycobiology*, 19, 1382–401.
- Eltoum, I. A., Siegal, G. P., Frost, A. R. (2002). Microdissection of histologic sections : past, present and future, *Advances in Anatomic Pathology*, 9, 316–322.
- Emmert-buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Liotta, L. A. (1996). Laser capture microdissection, *Science*, 274, 8–11.
- Espina, V., Wulfkühle, J. D., Calvert, V. S., VanMeter, A., Zhou, W., Coukos, G., Geho, D.H., Petricoin E.F., Liotta, L.A. (2006). Laser capture microdissection. *Nature Protocols*, 1, 586–603.
- Freire-de-Lima, L., Oliveira, I. a, Neves, J. L., Penha, L. L., Alisson-Silva, F., Dias, W. B., Todeschini, A. R. (2012). Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and Trypanosoma cruzi, *Frontiers in Immunology*, 3, 356.
- Galuska, S. P. (2012). Advances in sialic acid and polysialic acid detection methodologies, *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function*, 447–474.
- Galuska, S. P., Geyer, H., Weinhold, B., Kontou, M., Ro, C., Bernard, U., Gerardy-Schahn, R., Reutter, W., Münster-Kühnel, A., Geyer, R. (2010). Quantification of nucleotide-activated sialic acids labeling, *Analytical Chemistry*, 82, 4591–4598.

- Galuska, S. P., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Mühlenhoff, M., & Geyer, H. (2008). Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 17–28.
- Ghaderi, D., Springer, S. a, Ma, F., Cohen, M., Secrest, P., Taylor, R. E., Varki, A., Gagneux, P. (2011). Sexual selection by female immunity against paternal antigens can fix loss of function alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17743–17748.
- Hanover, J. A. (2001). Glycan-dependent signaling : O-linked. *The FASEB Journal*, 15, 1865-1876.
- Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M., Ohkura, Y. (1987). Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Analytical Biochemistry*, 164, 138–145.
- Hara S., Yamaguchi, M., Takemori , Y., Furuhashi, K., Ogura, H., Nakamura, M. (1989). Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by Fluorometric High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 179, 162–166.
- Hayakawa, T., Satta, Y., Gagneux, P., Varki, A, Takahata, N. (2001). Alu-mediated inactivation of the human CMP- N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 11399–11404.
- Hess, H., Rolde, E. (1964). Fluorometric assay of sialic acid in brain gangliosides. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 3215–3220.
- Hipp, J., Cheng, J., Hanson, J. C., Yan, W., Taylor, P., Hu, N., Rodriguez-Canales, J., Tangrea, M.A., Emmert-Buck, M.R., Balis, U. (2011). SIVQ-aided laser capture microdissection: A tool for high-throughput expression profiling. *Journal of Pathology Informatics*, 2, 19.
- Hipp, J. D., Cheng, J. Y., Toner, M., Tompkins, R. G., & Balis, U. J. (2011). Spatially invariant vector quantization: A pattern matching algorithm for multiple classes of image subject matter including pathology. *Journal of Pathology Informatics*, 2, 13.
- Holčapek, M., Jirásko, R., Líba, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography. A*, 1259, 3–15
- Honda, S., & Suzuki, S. (1984). Common conditions for high-performance liquid chromatographic microdetermination of aldoses, hexosamines, and sialic acids in glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, 142, 167–174.
- Nie, H., Li, Y., Sun, X.-L.(2012). Recent advances in sialic acid-focused glycomics. *Journal of Proteomics*, 75, 3098–3112.

- Inoue, S., Kitajima, K. (2006). KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconjugate Journal*, 23, 277–290.
- Inoue, S., Lin, S., Lee, Y. C., Inoue, Y. (2001). An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. *Glycobiology*, 11, 759–767.
- Jourdian, G. W., Dean, L., & Roseman, S. (1971). Substances of low molecular periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 430–435.
- Jun, L., Yuanshu, W., Yanying, X., Zhongfa, X., Jian, Y., Fengling, W., Xianjun, Q., Kokudo, N., Wie, T., Weixia, Z., Shuxiang, C. (2012). Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. *Medical Oncology*, 29, 84–90.
- Klein, A., Diaz, S., Ferreira, I., Lamblin, G., Roussel, P., Manzi, A.E. (1997). New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach: liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SIA quinoxalinones. *Glycobiology*, 7, 421–432.
- Klenk, E. (1941) Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift, Physiological Chemistry*, 268, 50-58.
- Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., Dennis, J.W. (2007). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 129, 123–134.
- Lewis, A. L., & Lewis, W. G. (2012). Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cellular Microbiology*, 14, 1174–1182.
- Livingston, B.D., Jacobs, J.L., Catherine, M., Troysli, F.A. (1988). Extended polysialic acid chains ($n > 55$) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 9443–9448.
- Lloyd, K.O., Old, L.J. (1989). Human monoclonal antibodies to glycolipids and other carbohydrate antigens : Dissection of the humoral immune response in cancer patients. *Cancer Research*, 49, 3445–3451.
- Lowry, O. H. (1953). The quantitative histochemistry of the brain: Histological sampling. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1, 420–428.
- Martin, M. J., Rayner, J. C., Gagneux, P., Barnwell, J. W., & Varki, A. (2006). Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: Relationship to human genetic loss of N-glycolyneuraminic acid. *National Academy of Science United States of America*, 103, 9745
- Matsuno, K., Suzuki, S. (2008). Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, 375, 53–59.
- Muchmore, E.A., Diaz, S., Varki, A. (1998). A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *American Journal of Physical Anthropology*, 107, 187–198.

- Padler-Karavani, V., Tremoulet, A. H., Yu, H., Chen, X., Burns, J. C., Varki, A. (2013). A simple method for assessment of human anti-Neu5Gc antibodies applied to Kawasaki disease. *PLoS ONE*, 8, e58443
- Ranjan, A., Kalraiya, R.D. (2013). α 2,6-Sialylation associated with increased β 1,6-branched N-oligosaccharides influences cellular adhesion and invasion. *Journal of Biosciences*, 38, 867–876.
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9, 26–35.
- Schauer, R.(1978). Characterization of sialic acids. *Methods Enzymology*, 50, 64-89.
- Schauer, R. (2001). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate Journal*, 17, 485–499.
- Schauer, R. (2004). Sialic acids: Fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*, 107, 49–64.
- Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 19, 507–514.
- Schneider, F., Kemmner, W., Haensch, W., Franke, G., Gretscher, S., Karsten, U., Schlag, P. M. (2001). Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid : Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Research*, 61, 4605–4611.
- Seales, E.C., Jurado, G.A., Brunson, B.A., Wakefield, J.K., Frost, A.R., Bellis, S.L. (2005). Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Research*, 65, 4645–4652.
- Seidenfaden, R., Krauter, A., Schertzinger, F., Gerardy-schahn, R., & Hildebrandt, H. (2003). Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 5908–5918.
- Sell, S. (1990). Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Human Pathology*, 21, 1003–1019.
- Simon, P., Bäumner, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., Galuska, S. P. (2013). Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 18825–18833.
- Büll, C., Stoel, M.A., den Brok, M.H., Den, Adema, G.J.(2014). Sialic acids sweeten a tumor ' s life. *Cancer Research*, 74, 3199–3205.
- Traving, C., Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 1330–1349.

- Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Miyagi, T. (2009). Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4. *Oncogene*, 28, 1218–1229.
- Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., Saboor, F., Galuska, S. P. (2013). Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 3695–3708.
- Varki, A., Kannagi, R., Toole, B.P. (2009). Glycosylation Changes in Cancer. *Essentials of Glycobiology, Chapter 44*, 1–17.
- Wang, P.-H., Lee, W.-L., Juang, C.-M., Yang, Y.-H., Lo, W.-H., Lai, C.-R., Yuan, C.-C. (2005). Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. *Gynecologic Oncology*, 99, 631–639.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Hildebrandt, H. (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 42971–42977.
- Weinhold, B., Sellmeier, M., Schaper, W., Blume, L., Philippens, B., Kats, E., Münster-Kühnel, A.K. (2012). Deficits in sialylation impair podocyte maturation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23, 1319–1328.
- Zaia, J. (2004). Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*, 23, 161–227.
- Zheng, J., Garg, S., Wang, J., Loose, D.S., Hauer-Jensen, M. (2013). Laser capture microdissected mucosa versus whole tissue specimens for assessment of radiation-induced dynamic molecular and pathway changes in the small intestine. *PloS One*, 8, e53711.